



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE CATÁLISE BIOMIMÉTICA - LACBIO**

**Funcionalização Combinatorial da Polietilenoimina e  
Caracterização Cinético Evolucionária como Modelo de  
Planejamento de Enzimas Artificiais**

**JUAN RICARDO**

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Gesser  
Co-Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

**FLORIANÓPOLIS**

**2008**

**JUAN RICARDO**

**FUNCIONALIZAÇÃO COMBINATORIAL DA  
POLIETILENOIMINA E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO  
EVOLUCIONÁRIA COMO MODELO DE PLANEJAMENTO DE  
ENZIMAS ARTIFICIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito para a obtenção de grau  
de Mestre em Química.

**FLORIANÓPOLIS**

**2008**

Juan Ricardo

**FUNCIONALIZAÇÃO COMBINATORIAL DA POLIETILENOIMINA E  
CARACTERIZAÇÃO CINÉTICO EVOLUCIONÁRIA COMO MODELO DE  
PLANEJAMENTO DE ENZIMAS ARTIFICIAIS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 06 de maio de 2008.

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Carlos Gesser  
Orientador

---

Prof. Adriano Martendal  
(UNISUL)

---

Prof. Dr. Josiel B. Domingos  
Co-orientador

---

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Graça  
Nascimento

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. José Carlos Gesser pela orientação, paciência e amizade. Assim como ao Prof. Josiel Barbosa Domingos, que participou na co-orientação desse trabalho com valiosas opiniões.

Agradeço também aos colegas de laboratório: Rosane, Fabrício, Deise, Mariana, Dayany, Caio, Edivandro, Renato e os novos colegas Kelly, Aline, Deonildo, Brunno e Welman.

Aos amigos feitos durante todo o curso de graduação e mestrado aqui da UFSC. Tanto àqueles que continuam em contato quanto aos que já foram embora mas que deixaram boas lembranças, além também aos amigos denominados de "Elite": Gisele, Ricardo, Gustavo, Valquíria, Didio, Roberta, Andreia, às Alines, às Tatianes, às Paulas, Júlio, Renato, Carlos, Rodrigo, Duda, André, Marcos, Luis e em especial à Taís, dentre tantos outros.

Aos professores do departamento de Química.

Aos professores que compõem a banca de avaliação desse trabalho, pelas ótimas sugestões.

À família, pelo apoio em todos os momentos.

E por fim, agradeço à CAPES, CNPq e à UFSC.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 ENZIMAS.....	1
1.1.1 Cinética de Reações Enzimáticas.....	3
1.1.2 Quimotripsina .....	7
1.2 ENZIMAS ARTIFICIAIS .....	10
1.2.1 Ciclodextrinas.....	10
1.2.2 Ciclofanos .....	14
1.2.3 Anticorpos catalíticos .....	17
1.2.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs).....	19
1.2.5 Polímeros Sintéticos.....	22
1.2.5.1 Polietilenoimina (PEI) .....	22
1.2.5.2 Derivatização de Polietilenoimina .....	23
1.2.5.3 Enzimas Artificiais a partir de Polietilenoimina Derivatizada.....	24
1.2.5.4 Química Combinatorial .....	26
<b>2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
3.1 REAGENTES E SOLVENTES.....	34
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	34
3.3 PREPARAÇÃO DE POLIETILENOIMINA DERIVATIZADA.....	35
3.3.1 Soluções .....	35
3.3.2 Metodologia para Derivatização Combinatorial da Polietilenoimina .....	35
3.4 ESTUDOS CINÉTICOS .....	39
3.4.1 Detecção dos Polímeros mais Efetivos .....	40
3.4.2 Perfil de pH .....	40
3.4.3 Obtenção de Parâmetros Cinéticos de Michaelis-Menten.....	41
3.4.3.1 Variação da Concentração de Substrato .....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
4.1 DERIVATIZAÇÃO DA POLIETILENOIMINA.....	42

4.2 MAPEAMENTO CINÉTICO DAS BIBLIOTECAS .....	45
4.2.1 Acetilação e dodecilação – Biblioteca 1 .....	45
4.2.2 Acetilação e benzilação – Biblioteca 2 .....	48
4.2.3 Acetilação e metilação – Biblioteca 3 .....	50
4.3 ANÁLISE DOS POLÍMEROS MAIS EFICIENTES .....	54
4.3.1 Efeito do pH .....	54
4.3.2 Efeito da Concentração de Substrato.....	57
4.3.3 Efeito do pH sobre os Parâmetros Cinéticos.....	64
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
5.1 PERSPECTIVAS .....	74
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de chave-fechadura proposto por Emil Fisher. ES é o complexo formado entre o substrato e a enzima através de ligações não-covalentes.....	2
Figura 2. Modelo de <i>ajuste induzido</i> . A forma do sítio ativo complementar ao substrato só é obtida depois que a enzima se liga ao substrato formando o complexo ES.....	2
Figura 3. Velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato em uma reação catalisada por enzima. $V_{max}$ representa a saturação do sítio ativo da enzima pelo substrato e $K_M$ é a concentração correspondente à metade da velocidade máxima da reação.....	5
Figura 4. Variação de energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) para uma reação não-catalisada (a) e catalisada por enzimas (b).....	5
Figura 5. Estrutura da quimotripsina onde os resíduos de Histidina57, Aspartato102 e Serina195 estão enfatizados.....	7
Figura 6. Representação da hidrólise de uma ligação peptídica. (A) acilação do resíduo da Ser195 e (B) hidrólise do complexo “acil-enzima”.....	8
Figura 7. Estrutura geral das ciclodextrinas, onde n pode ser 1, 2 e 3 ( $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente). ....	11
Figura 8. Gráfico de $k_{cat}$ versus pH para hidrólise do fosfato cíclico (5) por ciclodextrina. ....	13
Figura 9. Exemplos representativos de ciclofanos estudados em solvente aquoso. A) Lai, C. <i>et al</i> ; B) Dhaenes, M. <i>et al</i> ; C) Diederich, F; D) Petti, M. <i>et al</i> . ....	14
Figura 10. Reação de hidrólise de um éster catalisada por um anticorpo catalítico através do reconhecimento molecular do estado de transição. ....	18
Figura 11. Representação esquemática do processo de produção de um MIP. <sup>27</sup>	20
Figura 12. Estrutura de um segmento de PEI. ....	23
Figura 13. Espécies formadas na reação de PEI com iodeto de <i>n</i> -butila. ....	24
Figura 14. Velocidades iniciais graficadas contra a) os graus de alquilação (brometo de benzila mais iodeto de dodecila) de polietilenoimina e b) porcentagem de iodeto de dodecila nessa mistura. ....	28

Figura 15. Perfil de pH para a catálise da eliminação de Kemp (adaptado).....	28
Figura 16. A) Reação de trans esterificação intermolecular de HPNP. B) Derivatização de PEI utilizando i) praxadina e ii) iodeto de dodecila e brometo de benzila.....	29
Figura 17. Gráfico em 3D das velocidades iniciais em função dos graus de alquilação (brometo de benzila mais iodeto de dodecila) e guanidilação (praxadina) da PEI. O polímero mais efetivo foi o D9. [synzyme] = 3,0 $\mu$ M, [HPNP] = 1,0 mM, pH 8,0 a 30 °C.....	30
Figura 18. Gráfico de velocidades iniciais <i>versus</i> concentração de substrato mostrando comportamento típico de saturação conforme Michaelis-Menten (adaptado). [D9] = 3,44 $\mu$ M, [HPNP] = 0-2 mM, pH 7,85 a 30 °C.....	30
Figura 19. Micro-placas de 2 mL e micropipeta de 12 canais. ....	35
Figura 20. Metodologia para a derivatização do polímero.....	36
Figura 21. Representação da micro-placa para identificação das combinações de derivatização de polietileoimina. ....	37
Figura 22. Exemplo de polietilenoiminas derivatizadas com reagentes acetilantes e (A) dodecilante, (B) benzilante e (C) metilante.....	44
Figura 23. (a): Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes de brometo de dodecila e $\alpha$ -bromoacetato de <i>t</i> -butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; (b): gráfico de (a) apresentado em diferentes perspectivas; (c) vista de topo. [pNPA]=40 $\mu$ M, [polímero]=0,4 $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35 °C.....	47
Figura 24. (a): Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes de brometo de benzila e $\alpha$ -bromoacetato de <i>t</i> -butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; (b): gráfico de (a) apresentado em diferentes perspectivas; (c) vista de topo. [pNPA]=40 $\mu$ M, [polímero]=0,4 $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35 °C.....	49



- Figura 25. (a): Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes brometo de metila e  $\alpha$ -bromoacetato de *t*-butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; (b): gráfico em (a) apresentado em diferentes perspectivas; (c) vista de topo. [pNPA]=40  $\mu$ M, [polímero]=0,4  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35 °C..... 51
- Figura 26. Perfil de pH para os polímeros analisados na clivagem de pNPA. [pNPA] = 133  $\mu$ M, [polímero]= 0,4  $\mu$ M, tampão TRIS pH 7,0 – 9,3 e carbonato de sódio pH 9,3 - 9,5. 35 °C. (●) polímero 1.A09; (■) polímero 2.A11. Curvas ajustadas apenas com intuito de melhor visualização do gráfico..... 55
- Figura 27. Perfil de pH para os polímeros analisados na clivagem de pNPA. [pNPA] = 133  $\mu$ M, [polímero]= 0,4  $\mu$ M, tampão TRIS pH 7,0 – 9,3 e carbonato pH 9,3 - 9,4. 35 °C. (●) polímero 2.G09; (■) polímero 3E07. Curvas ajustadas apenas com intuito de melhor visualização do gráfico..... 56
- Figura 28. Velocidades iniciais em função da concentração de pNPA num comportamento de saturação da enzima pelo modelo de Michaelis-Menten. [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [1.A9]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,7 a 35 °C. (●) polímero 1.A09; (■) polímero 2.A11; (▲) polímero 2.G09 e (▼) polímero 3.E07..... 58
- Figura 29. Gráfico de Lineweaver-Burk obtido pela linearização da equação de Michaelis-Menten a partir dos dados da variação da concentração do substrato (0 - 2,98 mM) com a dos polímeros fixa em 0,8  $\mu$ M. Tampão TRIS 50 mM pH 7,7 a 35 °C. (■) polímero 1.A09, coef. correl. 0,9998; (●) polímero 2.A11, coef. correl. 0,9955; (▲) polímero 2.G09, coef. correl. 0,9997 e (▼) polímero 3.E07, coef. correl. 0,9988. .... 59
- Figura 30. Dependência de  $1/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 1.A09 (■) e 2.A11 (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35 °C. .... 65

- Figura 31. Dependência de  $k_{cat}$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 1.A09 (■) e 2.A11 (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35 °C. .... 67
- Figura 32. Dependência de  $k_{cat}/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 1.A09 (■) e 2.A11 (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35 °C. .... 68
- Figura 33. Dependência de  $1/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 2.G09 (●) e 3.E07 (■). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,1 a 35 °C..... 69
- Figura 34. Dependência de  $k_{cat}$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 2.G09 (●) e 3.E07 (■). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-8,8 a 35 °C..... 70
- Figura 35. Dependência de  $k_{cat}/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros 2.G09 (■) e 3.E07 (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,1 a 35 °C..... 71
- Figura 36. Modelo para interpretação dos grupos ionizáveis presentes no polímero artificial que contém grupos acetilas combinados com alquilas durante a etapa de associação polímero-substrato. .... 72
- Figura 37. Modelo para interpretação dos grupos ionizáveis presentes no polímero artificial que contém grupos acetilas combinados com alquilas durante a etapa de catálise do substrato. .... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a UIBBM. ....	6
Tabela 2. Parâmetros cinéticos para hidrólise de substratos com a quimotripsina. 9	
Tabela 3. Constantes de primeira ordem para a acilação de grupos amínicos por ésteres de <i>p</i> -nitrofenila.....	25
Tabela 4. Efetividade catalítica relativa na clivagem de acetato de <i>p</i> -nitrofenila... 26	
Tabela 5. Número de equivalentes de agente acetilante para as cavidades de A-G e agente alquilante para as cavidades que variam de 1-11. ....	37
Tabela 6. Protocolo para concentração de agente acetilante nas bibliotecas.....	38
Tabela 7. Protocolo para concentração de agente alquilante nas bibliotecas.....	39
Tabela 8. Comparação das constantes de velocidades entre os polímeros mais eficientes das três bibliotecas e os polímeros não derivatizados.....	53
Tabela 9. Comparação dos parâmetros cinéticos obtidos para as quatro <i>synzymes</i> das três bibliotecas a partir da variação de concentração de substrato.....	60
Tabela 10. Comparação dos parâmetros cinéticos das quatro <i>synzymes</i> das três bibliotecas com dados de enzimas naturais e artificiais.....	62

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Modelo cinético de Michaelis-Menten para uma reação enzimática. ...	3
Esquema 2. Mecanismo de hidrólise do acetato de <i>p</i> -nitrofenila pela $\alpha$ -quimotripsina.....	9
Esquema 3. Reação de hidrólise de fosfato cíclico por ciclodextrina funcionalizada com grupos imidazol. ....	12
Esquema 4. Reação catalisada pela enzima mimética de Diederich. ....	16
Esquema 5. Catálise de hidrólise de éster ativado e carbonato por anticorpo catalítico.....	19
Esquema 6. Estrutura de análogo de estado de transição para a reação de hidrólise de éster para a construção de MIPs. ....	21
Esquema 7. Clivagem eliminativa de benzisoxazol: a Eliminação de Kemp. ....	27
Esquema 8. Modelo de reação enzimática onde estão envolvidos a etapa de associação e catálise. ....	61

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS**

E	enzima
$[E]_0$	concentração total de enzima
S	substrato
P	produto
ES	complexo enzima-substrato
$k_{cat}$	constante catalítica
$k_{não-catalisado}$	constante de velocidade para reação não catalisada
$t$	tempo
$V_0$	velocidade inicial
$V_{max}$	velocidade máxima
$K_M$	constante de Michaelis-Menten
$\Delta G^\ddagger$	variação de energia livre de ativação
$\Delta G$	variação de energia livre de Gibbs
$S^\ddagger$	estado de transição
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
$\delta$	delta
Ser	serina
His	histidina
pNPA	acetato de <i>p</i> -nitrofenila
Enz	enzima
pH	concentração hidrogeniônica
ThDP	tiamina difosfato
MIP	polímero molecularmente impresso
PEI	polietilenoimina
Da	Daltons
RMN $^1H$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ET	estado de transição
B	base
$pK_a$	logaritmo da constante de acidez
HPNP	2-hidroxipropil fosfato de <i>p</i> -nitrofenila
eq.	equivalentes
$M_f$	concentração final
alq.	grupos alquil
dod.	grupos dodecil
guanid.	guanidilação
ben.	benzilação
acil.	acilação
v.	velocidade
TRIS	tampão tris(hidroximetil)aminometano
HEPES	tampão ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico
1.A09	PEI derivatizado contendo grupos dodecílicos
2.A11	PEI derivatizado contendo grupos benzílicos
2.G09	PEI derivatizado contendo grupos acetílicos e benzílicos
3.E07	PEI derivatizado contendo grupos acetílicos e metílicos

## RESUMO

Numerosas tentativas têm sido feitas para preparar polímeros sintéticos mimetizando enzimas. As enzimas artificiais (synzymes) têm o potencial de superar as limitações, em laboratório das enzimas naturais. Algumas enzimas artificiais são propostas nesse trabalho. Elas foram produzidas a partir da derivatização de polietilenoimina (PEI) com diferentes combinações estequiométricas de agentes acetilantes e alquilantes. Três bibliotecas foram construídas: i) contendo PEI e agentes acilantes e dodecilantes (**1**), ii) acilantes e benzilantes (**2**) e iii) acilantes e metilantes (**3**). A efetividade catalítica dos polímeros foi analisada através de métodos cinéticos pela reação de clivagem de acetato de *p*-nitrofenila. Os polímeros de melhor atividade catalítica foram: **1.A09** e **2.A11**, derivatizados apenas por grupos aquílicos e **2.G09** e **3.E07**, derivatizados por combinações de grupos acetilas e alquilas. Esses polímeros foram testados por parâmetros cinéticos segundo o modelo de Michaelis-Menten. Todos os polímeros apresentaram perfis de saturação pelo substrato e os valores de  $pK_a$  aparentes envolvidos nas catálises foram obtidos e indicaram ser de grupos amino dos polímeros derivatizados. Os resultados foram surpreendentes e mostraram grande eficiência das enzimas artificiais comparadas tanto com as enzimas naturais quanto a outros modelos de enzimas artificiais.

Palavras-chave: polietilenoimina, derivatização e enzimas artificiais.

## ABSTRACT

Several attempts have been made to produce synthetic polymers in laboratories with catalytic activity mimicking enzymes. The artificial enzymes (synzymes) have the potential of overcome the working laboratory limitations of the natural enzymes. Some of these synzymes are developed in this work. They were produced from the process of derivatization of the polyethylenimine (PEI) in different stoichiometric combinations with acylant and alkylant agents. Three libraries were built: i) containing PEI and also acylant and dodecylant agents (**1**); ii) acylant and benzylant agents (**2**) and iii) acylant and methylant agents (**3**). The catalytic effectiveness of these polymers was analysed through kinetic methods of the cleavage reaction of the *p*-nitrophenyl acetate. The polymers that reached the best catalytic performance were: **1.A09** and **2.A11**, derivatized for just some alkylic groups and **2.G09** and **3.E07**, derivatized by combining acetyl groups with alkyl groups. These polymers were all tested through kinetic screening according to Michaelis-Menten model. All the polymers exhibited saturation behavior by substrate and the apparent  $pK_a$  were determined to be those of the amine group of the derivatized polymer. The results were surprising and the artificial enzymes were widely efficient if compared to either natural enzymes systems or other types of artificial enzymes.

Key words: polyethylenimine, derivatization and artificial enzymes.



# 1 INTRODUÇÃO

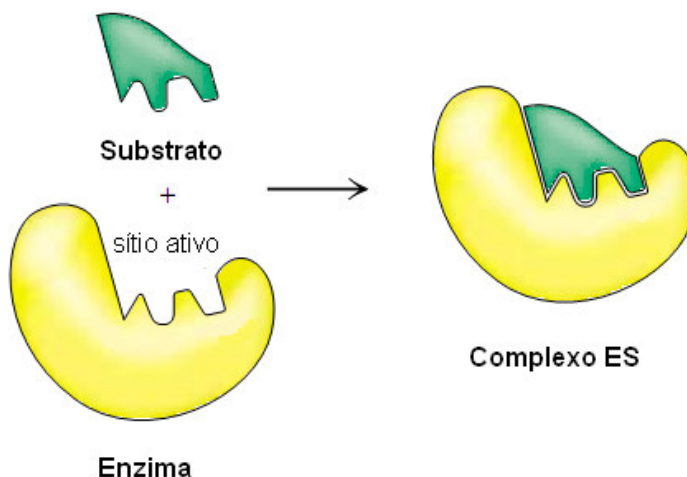
## 1.1 ENZIMAS

A vida, como a conhecemos, é dependente de uma série de reações químicas altamente sincronizadas. Porém, muitas dessas reações ocorrem em velocidades abaixo do que seria necessário para a sua sustentabilidade. Por isso, a natureza desenvolveu catalisadores que aceleram essas reações químicas de forma surpreendente, tornando-os por tanto, imprescindíveis para várias formas de vida, desde as bactérias até o homem. Esses catalisadores de extrema importância são chamados de enzimas.<sup>1</sup>

As primeiras aplicações de reações enzimáticas referem-se a seu uso na produção de alimentos como queijos, pães, bebidas alcoólicas entre outros<sup>1</sup> e ainda hoje são muito usadas na indústria. Além disso, são de grande interesse para a ciência, pois a origem do fascinante processo catalítico executado pelas enzimas ainda, sob muitos aspectos, permanece incompleto.<sup>2</sup> sua especificidade, capacidade de ação sob um determinado substrato, sempre foi um fator intrigante no estudo de reações enzimáticas e vários modelos foram propostos para explicar os princípios estereoquímicos envolvidos no processo de reconhecimento molecular.<sup>3</sup>

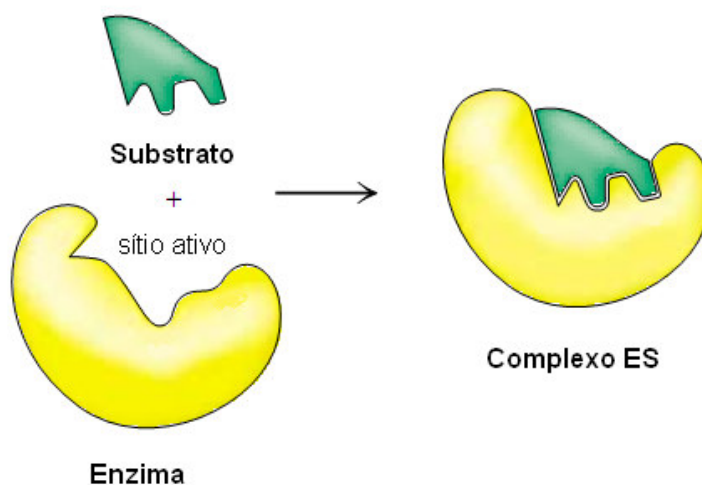
Em 1894, Emil Fisher<sup>4</sup> propôs o modelo de chave-fechadura para o entendimento do sistema de catálise enzimática, Figura 1. Nessa proposta as enzimas interagem com os substratos através de interações não-covalentes e requerem contato direto entre ambos. O substrato precisa ter a forma exata do sítio ativo da enzima, assim formando o complexo enzima-substrato, ES. Além disso, através desse modelo, onde a enzima catalisa um substrato em específico, se tinha, assim como hoje, a idéia clara de como seria inútil uma fechadura sem sua própria chave como explicação da especificidade desse catalisador.<sup>4</sup>

Porém, hoje se sabe que as enzimas na verdade são flexíveis e as formas dos sítios ativos das enzimas podem ser modificadas ao se ligarem ao substrato.



**Figura 1.** Modelo de chave-fechadura proposto por Emil Fisher. ES é o complexo formado entre o substrato e a enzima através de ligações não-covalentes.

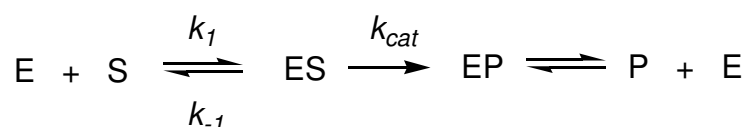
Algumas enzimas possuem o sítio ativo que se modifica a fim de obter a forma complementar ao substrato assim que se liga ao mesmo. Esse processo é chamado de *ajuste induzido* e foi proposto em 1958 por Daniel E. Koshland Jr<sup>5</sup> e está representado na Figura 2.



**Figura 2.** Modelo de *ajuste induzido*. A forma do sítio ativo complementar ao substrato só é obtida depois que a enzima se liga ao substrato formando o complexo ES.

### 1.1.1 Cinética de Reações Enzimáticas

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten,<sup>1</sup> a partir dos estudos de Victor Henri de 1903, propuseram um modelo simples para descrever as propriedades cinéticas das enzimas, já que havia a necessidade de uma descrição cinética de sua atividade catalítica para entender seu funcionamento. Segundo Michaelis e Menten, o processo ocorria, de forma geral, por duas reações elementares onde ocorria a formação de um complexo entre a enzima e o substrato que, em seguida, era transformado em produto e regenerava a própria enzima (Esquema 1):



**Esquema 1.** Modelo cinético de Michaelis-Menten para uma reação enzimática.

E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo enzima substrato e P o produto da reação. Se o primeiro e o segundo equilíbrios são rápidos e há completa formação de ES, então, a etapa  $k_{cat}$  é a limitante da velocidade e a equação de velocidade pode ser representado pela Equação 1.

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} [ES] \quad \text{Eq. 1}$$

Usando a suposição do estado estacionário e as equações de velocidade da reação enzimática, chega-se na Equação 2:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. 2}$$

onde  $[E]_0 = [E] + [ES]$ , concentração total de enzima e  $K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$

$K_M$  é chamada de constante de Michaelis-Menten, que é a concentração do substrato onde a velocidade da reação é exatamente a metade da velocidade máxima. Sua magnitude pode variar com o tipo de enzima e com seu substrato e muitas vezes é usada como medida relativa da afinidade de ligação da enzima ao substrato.<sup>6</sup> A constante  $k_{cat}$  é definida como *turnovers*, que é o número de moléculas de substrato que são convertidos em produtos numa unidade de tempo. Já  $k_{cat}/K_M$  é uma medida de eficiência para comparação de diferentes enzimas. Também é usado para comparar a utilização de diferentes substratos para uma mesma enzima. E por isso, é também chamada de constante de especificidade.

A partir dessas considerações a Equação 2 pode ser substituída na Equação 1 obtendo-se a Equação 3.

$$V_0 = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Eq. 3}$$

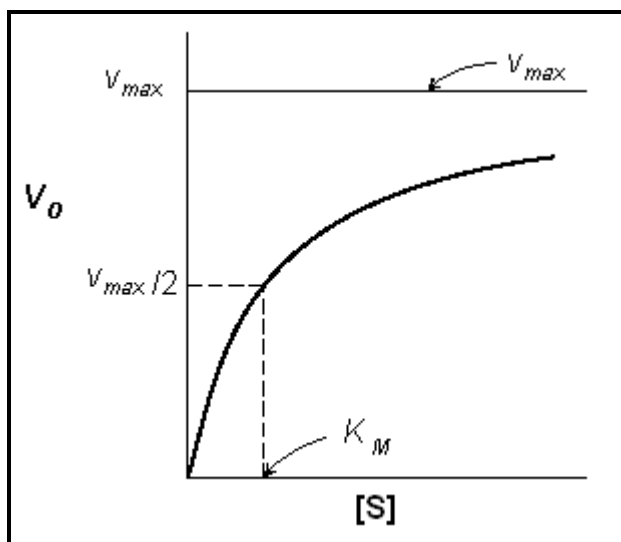
Para muitas enzimas, a velocidade inicial,  $V_0$ , varia com a concentração de substrato,  $[S]$ , segundo a Figura 3. A velocidade máxima, representada pelo gráfico, descreve a concentração do substrato na qual o sítio catalítico da enzima está completamente saturado pelo substrato. Assim, não havendo mais enzimas livres,  $[ES]$  será igual à  $[E]_0$  e a equação de velocidade pode ser descrita pela Equação 4,

$$V_{max} = k_{cat} [E]_0 \quad \text{Eq. 4}$$

que agora pode ser substituída na Equação 3, para obtenção da Equação 5.

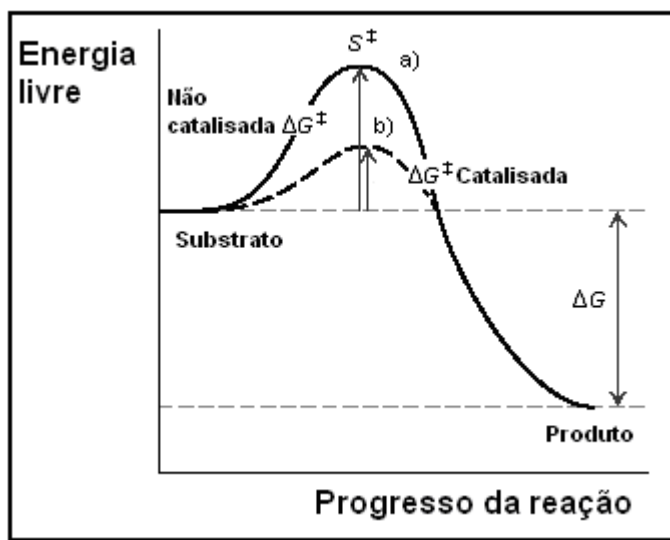
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Eq. 5}$$

A Figura 3 se ajusta bem a Equação 5. Em concentrações baixas de substrato, onde,  $[S]$  é menor que  $K_M$ ,  $V_0$  será igual à  $V_{max} [S] / K_M$ . Já em concentrações maiores de substrato, sendo,  $[S]$  muito maior que  $K_M$ ,  $V_0 = V_{max}$ .<sup>5</sup>



**Figura 3.** Velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato em uma reação catalisada por enzima.  $V_{max}$  representa a saturação do sítio ativo da enzima pelo substrato e  $K_M$  é a concentração correspondente à metade da velocidade máxima da reação.

Em 1946, Linus Pauling,<sup>7</sup> propôs que as enzimas podiam catalisar as reações porque têm maior afinidade pelo estado de transição da reação do que teriam pelo substrato ou produto. Dessa forma, haveria uma diminuição da energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) acelerando a reação, conforme representado na Figura 4.



**Figura 4.** Variação de energia livre de ativação ( $\Delta G^\ddagger$ ) para uma reação não-catalisada (a) e catalisada por enzimas (b).

Ainda nos anos 50 e 60,<sup>1</sup> novas hipóteses surgiam para a explicação da atuação das enzimas. Considerando o estudo intensivo a cerca das enzimas e a grande variedade de reações catalisadas pelas mesmas, em 1964, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) desenvolveu uma nomenclatura para trazer mais consistência à classificação das enzimas.

As reações catalisadas foram divididas em seis grupos, cada grupo uma classe de enzima, Tabela 1.<sup>5,8,9</sup> Entre as enzimas hidrolíticas, que são as mais usadas em síntese orgânica estão as amidases, nitrilases, fosfatases, lipases e as proteases. Uma das proteases mais amplamente estudadas é a quimotripsina.<sup>9</sup>

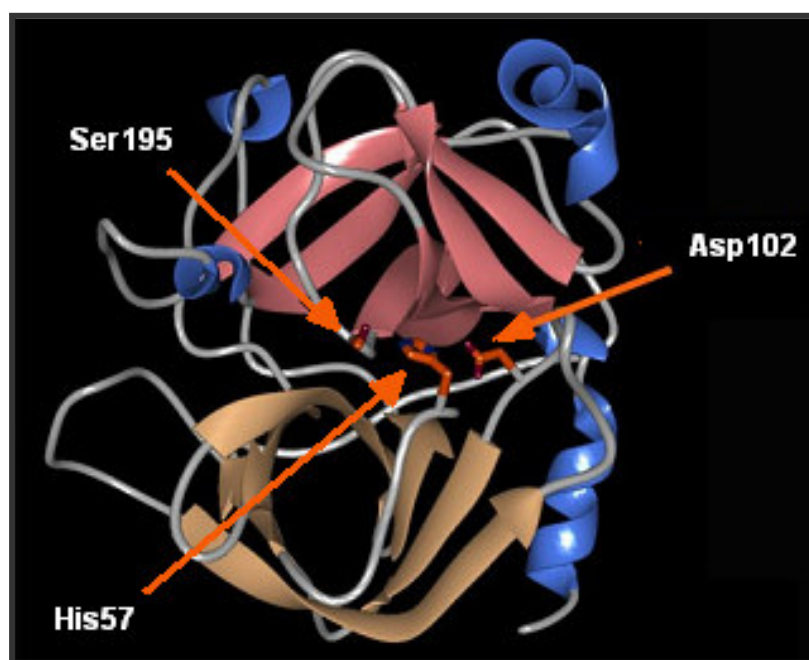
**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a UIBBM.

<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação</b>	<b>Exemplos</b>
1. Oxidoredutases	Transferência de elétrons ou remoção de hidrogênio	Lactato desidrogenase
2. Transferases	Reações de transferência de grupos	Nucleosídeo monofosfato kinase
<b>3. Hidrolases</b>	<b>Reações de hidrólise</b>	<b>Quimotripsina</b>
4. Liases	Reações de adição de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Fumarase
5. Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Treose fosfato isomerase
6. Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Aminoacil-tRNA sintetase

### 1.1.2 Quimotripsina

A quimotripsina é sintetizada no pâncreas numa forma inativa, a clivagem de alguns resíduos de aminoácidos em sua estrutura por outras enzimas proteolíticas a transformam em suas formas ativas, a  $\alpha$ - e a  $\delta$ -quimotripsina.<sup>10</sup>

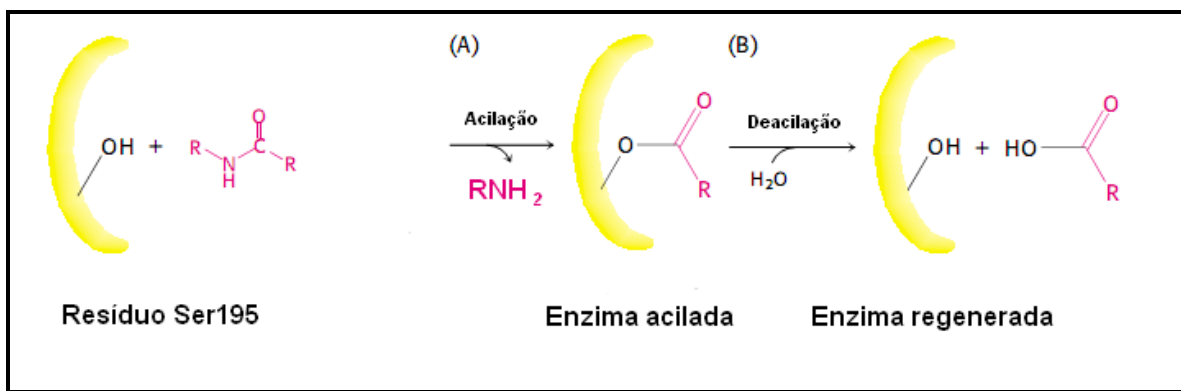
A quimotripsina catalisa a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas, principalmente, adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos. Estudos de cristalografia de Raios-X<sup>8</sup> identificaram os resíduos dos aminoácidos Serina195, Histidina57 e Aspartato102 formando a tríade catalítica que constitui o sítio ativo da enzima. A Figura 5, mostra uma representação tridimensional do sítio ativo da quimotripsina, onde os três grupos funcionais estão enfatizados.



**Figura 5.** Estrutura da quimotripsina onde os resíduos de Histidina57, Aspartato102 e Serina195 estão enfatizados.

A velocidade da hidrólise de uma ligação peptídica por essa enzima é de uma magnitude de cerca de  $10^9$  vezes em relação à hidrólise espontânea. Essa reação ocorre através de duas etapas: na primeira, descrita como uma reação de acilação do resíduo Serina195, onde a ligação peptídica é clivada e uma ligação éster é formada entre o carbono carbonílico do peptídeo e a enzima. Na segunda

etapa, a deacilação, a ligação éster formada pelo resíduo de serina é hidrolisada regenerando a enzima e está representada na Figura 6.



**Figura 6.** Representação da hidrólise de uma ligação peptídica. (A) acilação do resíduo da Ser195 e (B) hidrólise do complexo “acil-enzima”.

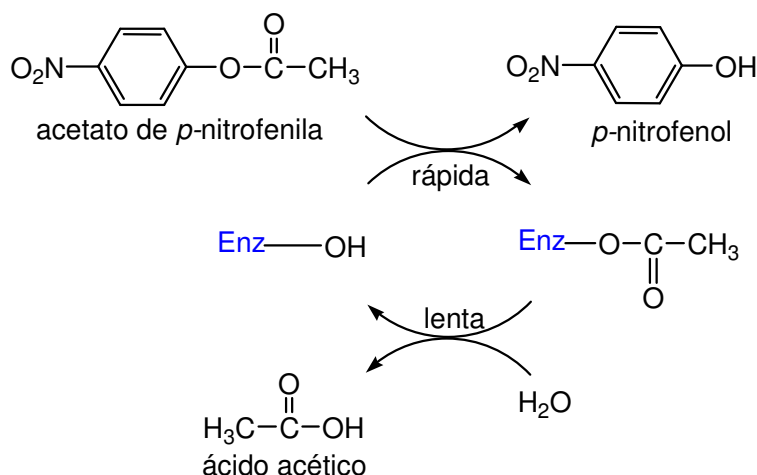
Além da ação catalítica sobre os peptídeos, a quimotripsina também catalisa a hidrólise de pequenos ésteres e amidas. Essas reações são muito mais lentas, pois, uma menor energia de ligação é disponível para substratos menores, dessa forma, são mais fáceis de serem estudados.<sup>8</sup>

Em 1954, Kilby e Harley<sup>8</sup> descobriram que a quimotripsina promovia a hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila (pNPA) e as etapas de mecanismo envolvidas eram similares para a hidrólise de um substrato específico para a  $\alpha$ -quimotripsina, Esquema 2.<sup>11</sup>

O mecanismo ocorre em duas etapas. Na primeira etapa a enzima é acilada pelo acetato de *p*-nitrofenila, numa etapa rápida, formando uma ligação éster no sítio ativo da enzima (complexo acil-enzima). Na segunda etapa, que é lenta, a enzima é deacilada pela água, e assim é regenerada.

Porém, como era de se esperar os parâmetros cinéticos condizem com uma reação mais efetiva para substratos específicos para a quimotripsina, como é o caso do metil N-acetil-L-triptofano quando comparada com a hidrólise do pNPA pela mesma.





**Esquema 2.** Mecanismo de hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila catalisada pela  $\alpha$ -quimotripsina.

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros cinéticos entre a hidrólise de metil N-acetil-L-triptofano pela  $\delta$ -quimotripsina,<sup>12</sup> a hidrólise do pNPA pela  $\delta$ -quimotripsina<sup>13</sup> e a hidrólise de pNPA pela  $\alpha$ -quimotripsina.<sup>14</sup>

**Tabela 2.** Parâmetros cinéticos para hidrólise de substratos com a quimotripsina.

Enzima	Substrato	pH*	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
$\delta$ -Quimotripsina	N-acetil-L-triptofano	7,92	0,09	36
$\delta$ -Quimotripsina	acetato de <i>p</i> -nitrofenila	7,91	1,36	4,73
$\alpha$ -Quimotripsina	acetato de <i>p</i> -nitrofenila	7,80	1,12	3,96

\*Força iônica 0,1 M; Tampão TRIS-HCl; 25 °C em 1,6% (v/v) acetonitrila-água.

Esses resultados demonstram uma alta associatividade,  $1/K_M$ , da  $\delta$ -quimotripsina com um substrato específico, assim como uma alta constante de velocidade para a etapa de acilação da mesma,  $k_{cat}$ , pelo N-acetil-L-triptofano.

Comparativamente, os resultados para a hidrólise do pNPA pela quimotripsina ainda são pouco significativos comparados à reação com o substrato específico. O que significa que a busca de catalisadores que hidrolisem compostos, como o pNPA, com uma eficiência maior seja um grande desafio.

Este desafio gerou uma nova linha de investigação na qual os aspectos catalíticos e as limitações das enzimas naturais – como a intolerância a solventes orgânicos, variação de pH e temperatura, por exemplo – são elementos sob constante análise. Assim, químicos e bioquímicos têm planejado a síntese de enzimas artificiais equivalentes às enzimas naturais com a expectativa de obter resultados que rivalizem as enzimas naturais em termos de aceleração de reações, especificidade e múltiplos *turnovers* (frequência na qual o substrato é convertido a produto por sítio ativo de enzima).<sup>15</sup>

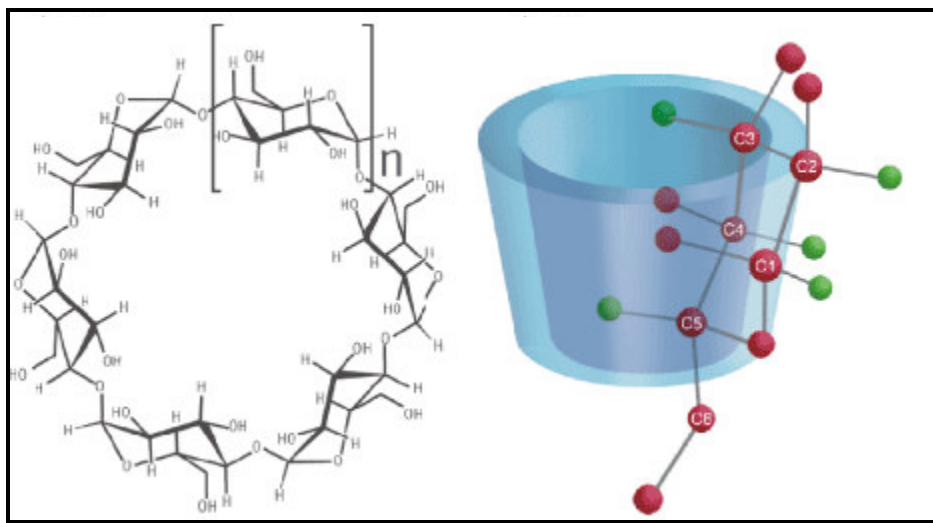
## 1.2 ENZIMAS ARTIFICIAIS

Como as enzimas levaram bilhões de anos para desenvolver uma sofisticada estrutura tridimensional, os cientistas precisavam encurtar esse período para uma escala bem menor de tempo, considerando sua longevidade para a pesquisa. Com isso, vieram descobertas, no campo de enzimas artificiais, como a síntese de moléculas bastante complexas que imitavam as enzimas. Contudo, pequenos erros de concepção provocavam resultados desastrosos. No entanto, avanços nos campos da biologia molecular, bioquímica, química polimérica, entre outros campos da ciência, trouxeram melhores soluções para a escolha de modelos e planejamento da síntese dessas enzimas sintéticas. Entre os muitos modelos que procuram simular uma ou mais características do processo enzimático pode-se citar: ciclodextrinas, ciclofanos, anticorpos catalíticos, polímeros molecularmente impressos e polímeros sintéticos.<sup>15</sup>

### 1.2.1 Ciclodextrinas

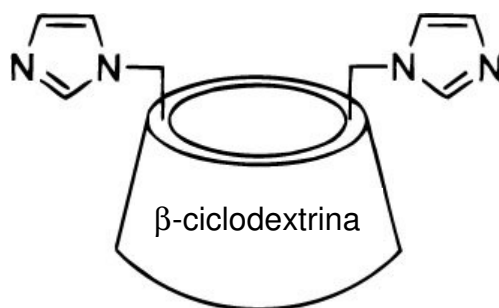
Ciclodextrinas são oligômeros cíclicos de glicose obtidos pela degradação enzimática de amilose.  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas tem seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente, em sua estrutura cíclica. A estrutura desses açúcares

fornece uma cavidade, conforme mostra a Figura 7, que imita o bolso hidrofóbico típico de muitas enzimas. Moléculas orgânicas pequenas e aromáticas, como os benzenos substituídos, mostram uma afinidade significativa pelas ciclodextrinas quando em solução aquosa e formam complexos de inclusão com as mesmas.<sup>16</sup>

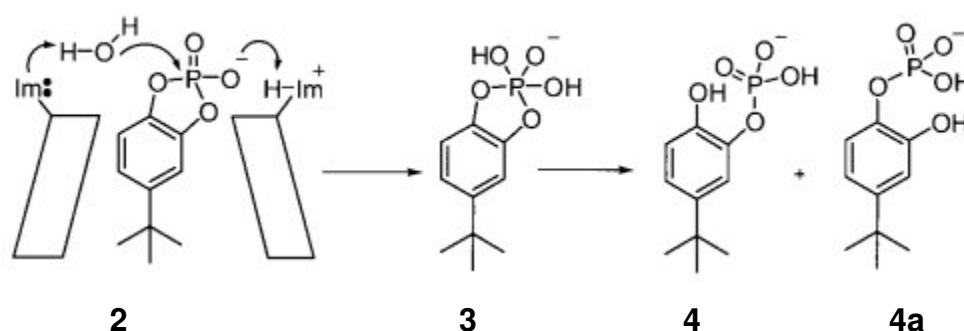


**Figura 7.** Estrutura geral das ciclodextrinas, onde  $n$  pode ser 1, 2 e 3 ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - ciclodextrinas, respectivamente).

As ciclodextrinas ainda podem ser funcionalizadas por grupamentos que mimetizam os resíduos de aminoácidos nas enzimas. Breslow e Schmuck em 1996,<sup>17</sup> funcionalizaram uma  $\beta$ -ciclodextrina com grupos imidazóis, **(1)**, mimetizando a Ribonuclease A, que utiliza os grupos Histidina12 e Histidina119 na hidrólise do RNA.

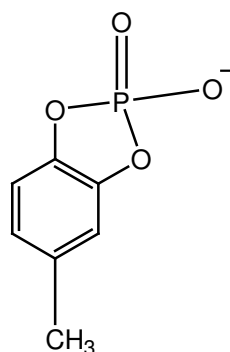


A reação de hidrólise do fosfato cíclico 4-*tert*-butil-catecol (**2**), catalisada pela ciclodextrina, Esquema 3, ocorre via intermediário (**3**) formando o produto (**4**) numa proporção de 99:1 comparado com o subproduto, (**4a**). Quando utilizado NaOH como catalisador da reação, o subproduto (**4a**) é formado em quantidade equimolar ao produto principal (**4**). Esse resultado mostra que ciclodextrina catalisa essa reação com uma seletividade, que é de 99:1, quase tão alta quanto a enzima natural.



**Esquema 3.** Reação de hidrólise de fosfato cíclico por ciclodextrina funcionalizada com grupos imidazol.

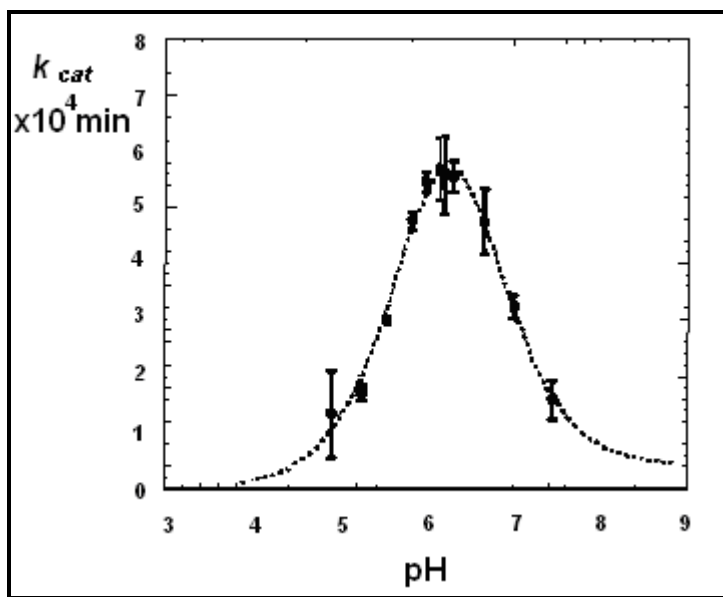
A constante catalítica da reação de hidrólise do fosfato cíclico (**2**), catalisada pela ciclodextrina,  $k_{cat}$ , é 120 vezes maior que a constante de velocidade para a reação não catalisada,  $k_{não-catalisado}$ , que é de  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .<sup>17</sup> Além disso, o gráfico de pH versus  $k_{cat}$ , para a reação de uma  $\alpha$ -ciclodextrina com um outro fosfato cíclico, o 4-metilcatecol (**5**), é representado por uma curva em forma de sino (bell-shaped), Figura 8.



**5**

Isso demonstra que esse substrato é hidrolisado por dois grupos catalíticos, que são o imidazol na forma básica e o outro na forma ácida.

Esses dados condizem também com o mecanismo proposto no Esquema 3, que é o mesmo mecanismo usado pela Ribonuclease A para a hidrólise de fosfatos constituintes do RNA.<sup>18</sup>

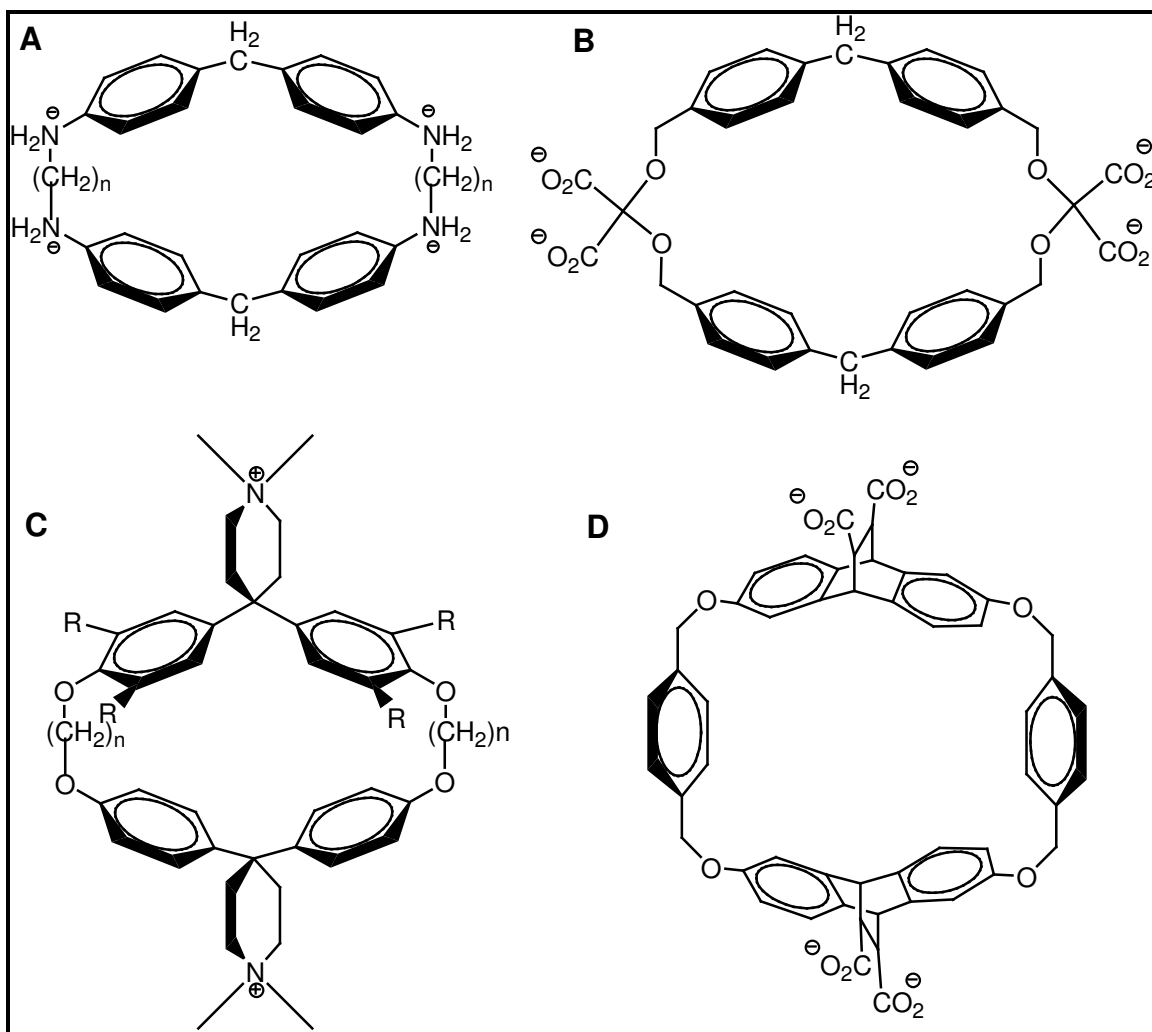


**Figura 8.** Gráfico de  $k_{cat}$  versus pH para hidrólise do fosfato cíclico (5) por ciclodextrina.<sup>18</sup>

As ciclodextrinas foram muito importantes para o estabelecimento de muitos princípios na química biomimética, contudo, elas são muito limitadas pelo fato de que não é possível aumentar o tamanho da sua cavidade. Caso um composto tenha uma dimensão maior que a cavidade, a ciclodextrina não poderá ser usada em reações para esse substrato. Além disso, as ciclodextrinas não são facilmente funcionalizadas. Por isso, muitos cientistas voltaram sua atenção para o estudo de ciclofanos.

### 1.2.2 Ciclofanos

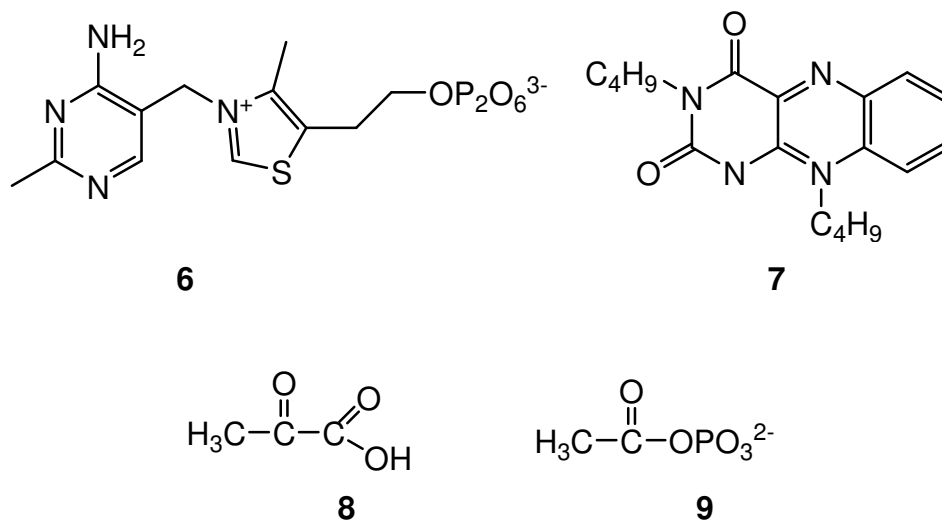
Essa nova classe de modelos miméticos de enzimas é referente a compostos cíclicos formados por anéis aromáticos como parte do ciclo, assim como os exemplos dados na Figura 9.



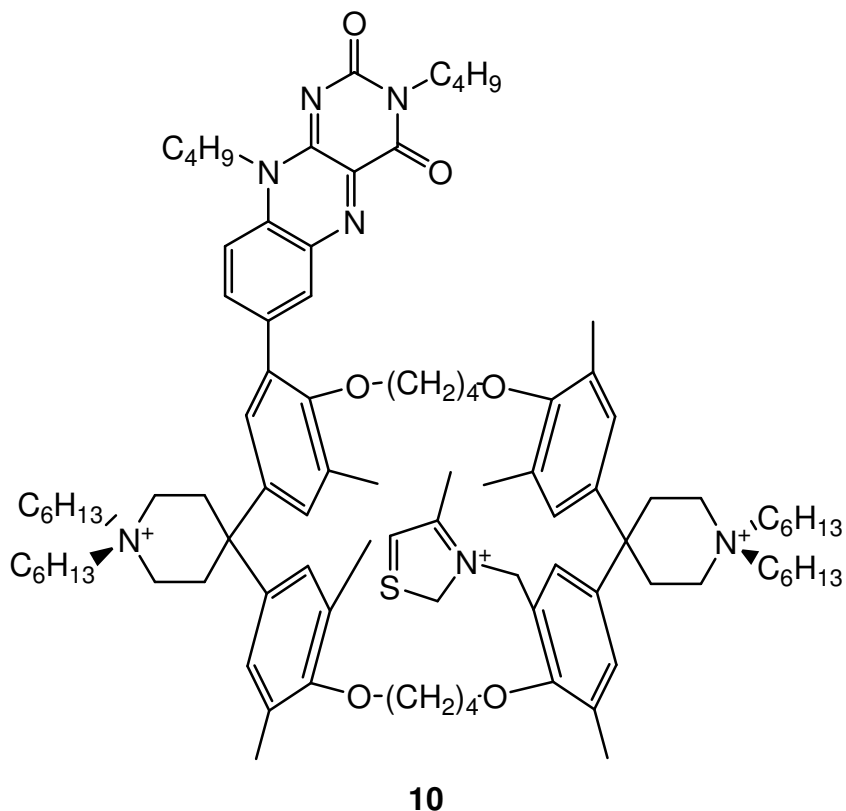
**Figura 9.** Exemplos representativos de ciclofanos estudados em solvente aquoso. A) Lai, C. *et al.*<sup>19</sup> B) Dhaenes, M. *et al.*<sup>20</sup> C) Diederich, F.<sup>21</sup> D) Petti, M. *et al.*<sup>22</sup>

Grupos hidrosolúveis podem ser anexados a esses compostos produzindo catalisadores de inúmeros tamanhos e formas que podem acomodar uma grande faixa de substratos.<sup>16</sup>

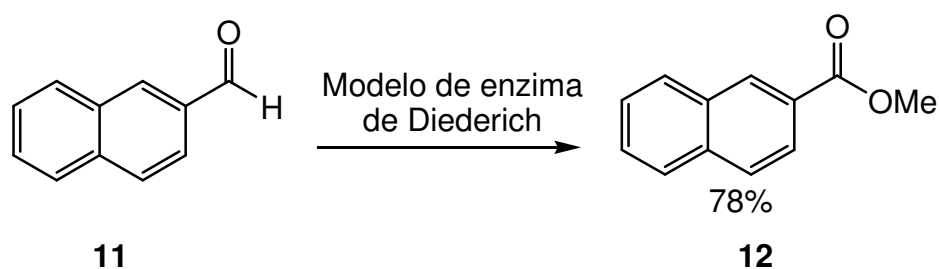
Um exemplo da aplicação de ciclofanos é um modelo de enzima artificial para a piruvato oxidase de Diederich.<sup>23</sup> A enzima natural, piruvato oxidase, emprega dois co-fatores, a tiamina difosfato (ThDP) (**6**) e a flavina (**7**), na catálise da transformação do piruvato, (**8**), em acetil fosfato, (**9**).



O modelo de enzima de Diederich, (**10**), possui um sítio de ligação bem definido contendo a própria flavina e o grupo tiazol, proveniente do ThDP, ligados covalentemente à sua estrutura.



Este modelo de enzima artificial catalisa a reação do naftaleno-2-carbaldeído, (**11**), à naftaleno-2-carboxilato de metila, (**12**), com um  $k_{cat}$  de  $0,22\text{ s}^{-1}$ , Esquema 4.



**Esquema 4.** Reação catalisada pela enzima mimética de Diederich.

A construção de enzimas sintéticas, como as ciclodextrinas e os ciclofanos, é uma tarefa que requer uma demanda de tempo e esforço extremamente altos. Por isso, ao invés de se construir uma estrutura complexa pode-se utilizar parcialmente um sistema biológico.<sup>3</sup>



Uma das formas mais versáteis está no uso do sistema imunológico de mamíferos para produzir anticorpos catalíticos.<sup>24</sup>

### 1.2.3 Anticorpos catalíticos

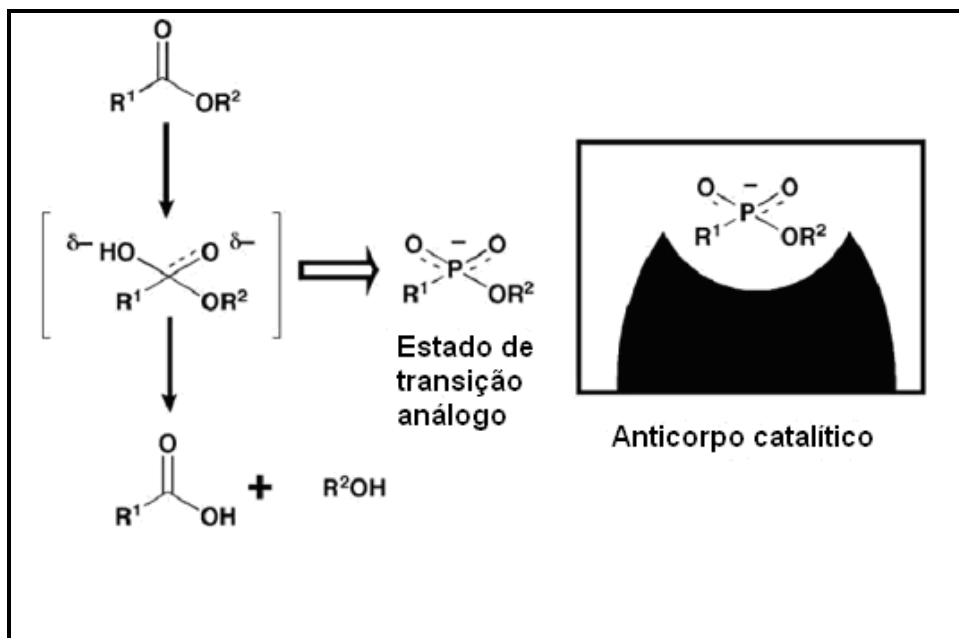
O sistema imunológico tem uma surpreendente habilidade de construir compostos que se ligam às substâncias estranhas ao corpo, os antígenos. Um anticorpo é criado para cada antígeno identificado pelo sistema imunológico. A seqüência de aminoácidos, no sítio de reconhecimento dos anticorpos, pode ser modificada através dos códigos genéticos, portanto, os anticorpos podem reconhecer uma grande variedade de antígenos através de uma seqüência específica de aminoácidos. Esse processo biológico é muito útil, se considerarmos que as enzimas usam também de sua estrutura para reconhecer seus substratos.

Vários anticorpos contendo os mesmos grupamentos funcionais que constituem o sítio ativo da enzima podem ser produzidos pelo sistema imunológico, porque o sistema pode produzir um anticorpo correspondente ao estado de transição de uma reação que se tenha interesse. Esse tipo de enzima artificial é chamado de anticorpo catalítico ou *abzimas*.<sup>3</sup>

Um estado de transição é instável e um análogo ao estado de transição da reação em *si* é usado para construir o anticorpo catalítico pelo sistema imunológico. Na Figura 10, é mostrado um exemplo de como um anticorpo catalítico é usado na hidrólise de um éster.

A hidrólise básica de um éster de ácido carboxílico ocorre via a formação de um estado de transição tetraédrico que é produzido pelo ataque nucleofílico de um íon hidróxido sobre o carbono carbonílico. Um éster de ácido fosfórico fornece um ótimo análogo para o estado de transição do éster de ácido carboxílico. Nesse exemplo, uma dose de éster de ácido fosfórico ligado à albumina foi dada a animais.

Anticorpos que reconheceram o análogo de éster carboxílico foram produzidos imunologicamente<sup>3</sup> e entre eles somente alguns são escolhidos devido a imensa faixa de anticorpos diferentes liberados.

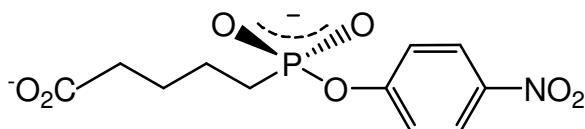


**Figura 10.** Reação de hidrólise de um éster catalisada por um anticorpo catalítico através do reconhecimento molecular do estado de transição.

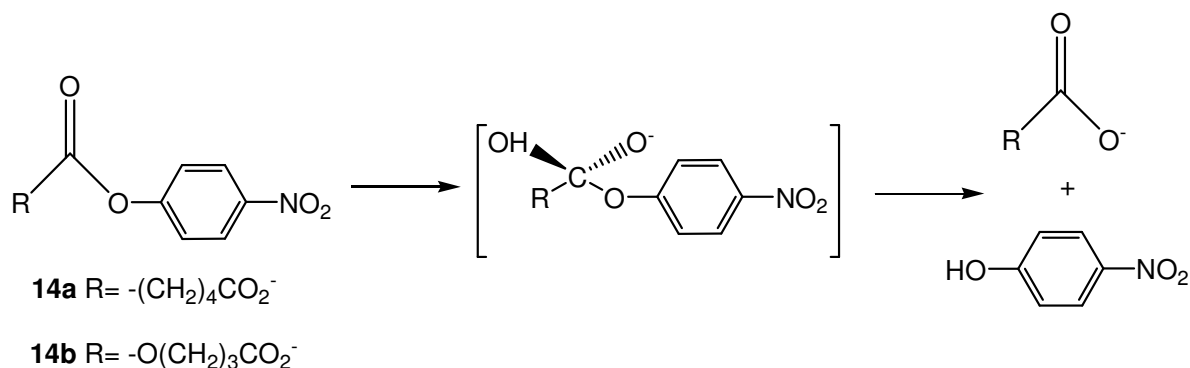
Além disso, sítios de ligação dos anticorpos catalíticos possuem dimensões comparáveis a de um sítio catalítico de uma enzima natural. Ao mesmo tempo, seguem a cinética de Michaelis-Menten e alcançam aceleração de velocidade muito significativa, geralmente entre  $10^3$  e  $10^5$  vezes quando comparada com o padrão correspondente; mas, ainda assim, numa magnitude bem abaixo das enzimas.<sup>24</sup>

A transferência de grupo acila tem sido o processo mais intensamente investigado usando-se a técnica de anticorpos catalíticos. A grande atenção dada a esse tipo de sistema reflete a grande utilidade das enzimas artificiais com capacidades hidrolíticas por um lado, e por outro a grande disponibilidade de análogos de estado de transição, como já visto, utilizando-se ésteres de fosfato.

O anticorpo catalítico 48G7,<sup>24</sup> produzido através do análogo 4-(carboxi)butil fosfonato de *p*-nitrofenila, (**13**), representa uma esterase.

**13**

O anticorpo catalítico 48G7 acelera a reação de hidrólise do éster (**14a**) e o carbonato (**14b**) por um fator de mais de  $10^4$  (Esquema 5).



**Esquema 5.** Catálise de hidrólise de éster ativado e carbonato por anticorpo catalítico.

O anticorpo catalítico age como um catalisador para o ataque do ânion hidróxido no carbono carbonílico. A carga negativa do grupo fosfato do análogo (**13**) e as ligações de hidrogênio possíveis no composto, imita bem as interações de uma serina protease com o estado de transição de uma reação de hidrólise.

Uma outra forma de se produzir sítios receptores que simulam a interação entre o anticorpo e o antígeno respectivo baseia-se na preparação de polímeros com impressão molecular, conhecidos como MIP (Polímeros Molecularmente Impressos).<sup>25</sup>

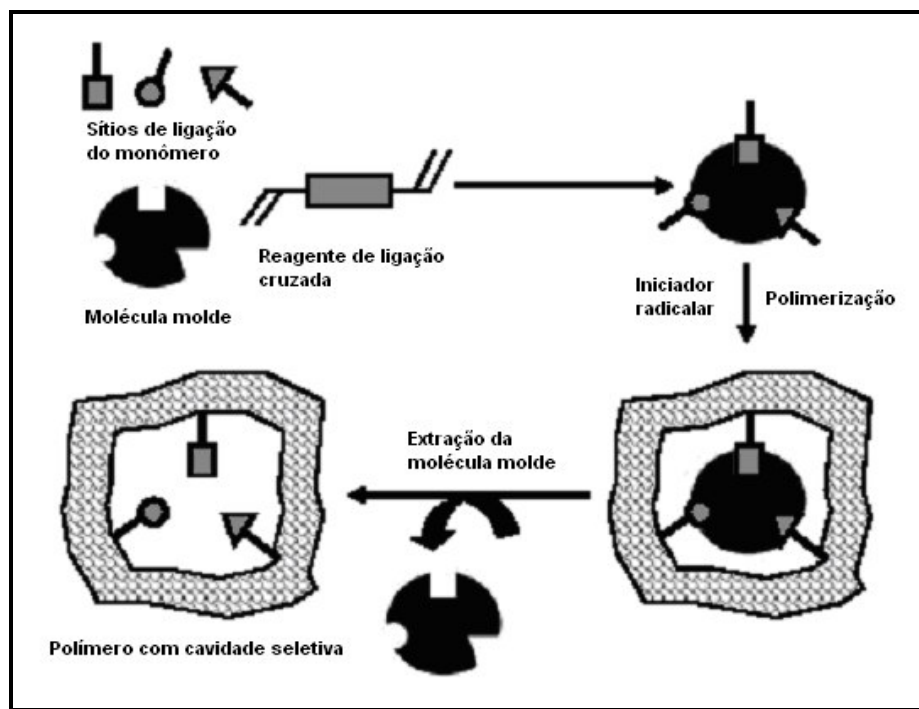
#### 1.2.4 Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)

O campo de estudos da impressão molecular de polímeros catalíticos é muito mais recente que o de anticorpos catalíticos, mas o conceito básico é muito similar. A impressão molecular é uma técnica de polimerização que produz polímeros com cavidades as quais se ligam de forma bem seletiva a moléculas

que foram impressas anteriormente no polímero. Se a molécula, assim como nos anticorpos catalíticos, se assemelha a um estado de transição de uma determinada reação, então, o MIP se comportaria como uma enzima.<sup>24</sup>

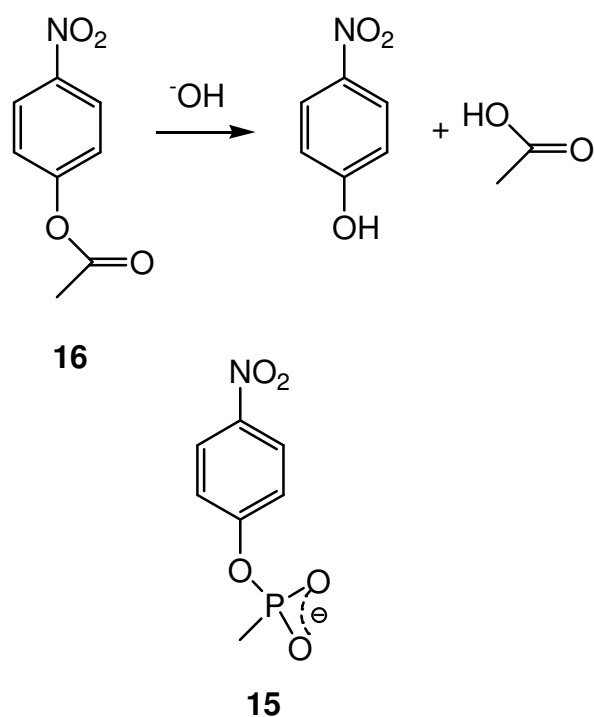
O processo na construção dos MIP é mostrado na Figura 11. Na primeira etapa, os monômeros contendo grupos funcionais, que podem interagir com a molécula de impressão, são organizadas a sua volta. Em seguida, é feita a polimerização desses monômeros, formando um polímero com ligações cruzadas em volta da molécula de impressão. E por último é feita a remoção da molécula impressa, deixando assim cavidades que possuem exatamente a forma do composto que foi impresso formando um polímero com cavidades que reconhecem o análogo de estado de transição da reação estudada.

Muitas reações obtiveram sucesso ao utilizarem MIPs.<sup>26</sup> Um exemplo de estruturas usadas para a construção de MIPs pode ser mostrado segundo o Esquema 6,<sup>27</sup> onde o composto metilfosfonato de *p*-nitrofenila **15**, é estruturalmente similar ao acetato de *p*-nitrofenila **16**, mas contém um grupo fosforil no lugar do grupo carboxil.



**Figura 11.** Representação esquemática do processo de produção de um MIP.<sup>27</sup>

Além disso, como com outros ésteres de fosfonato, **15** serve como um análogo de estado de transição para a promoção de hidrólise de ésteres como já visto na seção 1.2.3, anticorpos catalíticos.



**Esquema 6.** Estrutura do análogo de estado de transição (**15**) para a reação de hidrólise de éster (**16**) para a construção de MIPs.

O análogo, então, foi impresso usando como polímero o poli [4(5)-vinilimidazol]. Sabe-se que polímeros contendo grupos imidazóis catalisam a hidrólise de ésteres ativados<sup>28</sup> e como esperado o MIP produzido também catalisa a hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila. Porém, a construção de polímeros molecularmente impressos é complexa e pode ser dispendiosa. Já a construção de polímeros sintéticos como enzimas artificiais são mais simples e também eficientes.

### 1.2.5 Polímeros Sintéticos

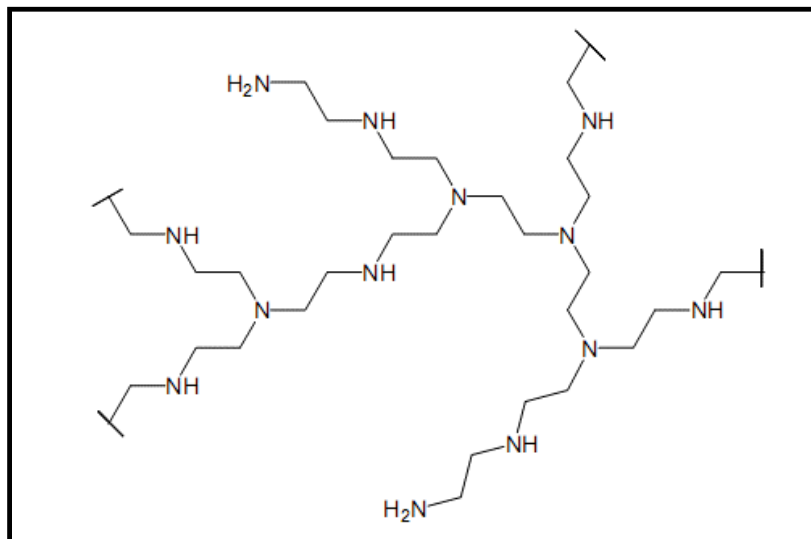
As enzimas em geral mostram uma grande seletividade quanto à etapa de ligação aos substratos, já que provém de grupos funcionais específicos para essa função, além de fornecer um microambiente perfeito que facilita a etapa de catálise. Por isso, o uso de polímeros sintéticos com atividade catalítica capazes de mimetizar as enzimas precisa envolver essas mesmas características: sítios hidrofóbicos que envolvam os substratos e grupos funcionais que promovam a catálise. Além disso, esses polímeros devem ser solúveis em solução aquosa, possuir uma cadeia polimérica flexível e ter afinidade por pequenas moléculas. Muitos polímeros foram estudados com essas características, entre eles o poli-vinilpirrolidina, poli-vinilpiridina, poli-lisina, poli-acrilamida entre outros.<sup>24</sup> Além dos citados, um polímero que tem sido intensamente estudado é a polietilenoimina (PEI).<sup>29-42</sup>

#### 1.2.5.1 Polietilenoimina (PEI)

A polietilenoimina é um polímero sintetizado pela polimerização de etilenoimina por catálise ácida. Sob condições normais de síntese a PEI tem um alto grau de ramificação sobre os nitrogênios amínicos. Possui 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias ligadas por unidades etilênicas, como observado na Figura 12. Pode também ser encontrado comercialmente com diferentes massas moleculares, por exemplo: 600, 25000 e 60000 Da.<sup>29</sup>

Esse polímero tem sido muito utilizado em várias áreas da pesquisa: química, biologia molecular e também na medicina no tratamento de câncer.<sup>37</sup>

Além disso, é uma macromolécula solúvel em solventes aquosos e os grupos amínicos do polímero agem como nucleófilos e por isso podem ser funcionalizados resultando em um polímero derivatizado com atividade catalítica.<sup>29</sup>



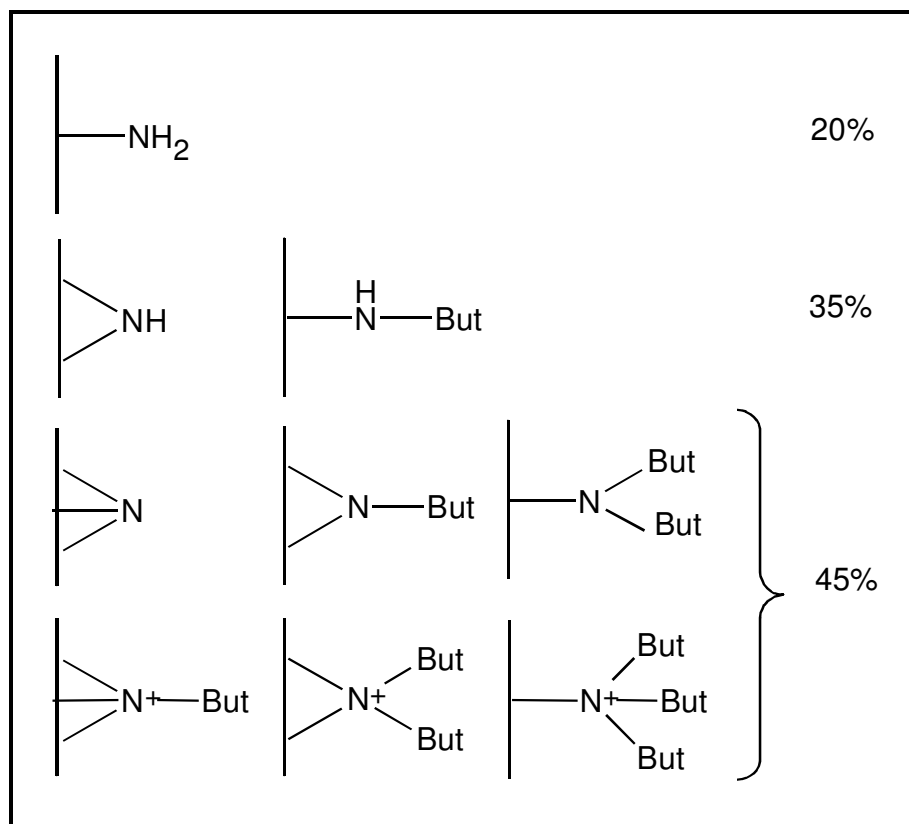
**Figura 12.** Estrutura de um segmento de PEI.

#### 1.2.5.2 Derivatização de Polietilenoimina

O fato de existir três diferentes tipos de grupos amínicos no polímero, o torna bem complexo, mais ainda quando ele é derivatizado. A funcionalização pode ocorrer nos sítios, tanto dos grupos primários e secundários como até nos grupos terciários. Johson e Klotz em 1974,<sup>29</sup> derivatizaram a PEI 60000 Da com grupos acilantes (ésteres e anidridos) e alquilantes (haletos de alquila). O polímero alquilado com o iodeto de *n*-butila foi estudado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e foi observado que restavam 20% de aminas primárias na forma livre, 35% de aminas secundárias e 45% de aminas terciárias e quartenárias de sal de amina, Figura 13.

Além disto, quando um grupo apolar é ligado a um resíduo amínico, ele influencia na formação de outro derivado vizinho, pois, a hidrofobicidade formada ajuda na formação da ligação de outro grupo apolar ao nitrogênio posicionado nas proximidades.<sup>15</sup>

No caso da acetilação foram observados que 25% das aminas primárias foram acetiladas e somente algumas aminas secundárias sofreram funcionalização utilizando-se como agente acilante o anidrido acético.<sup>29</sup>



**Figura 13.** Espécies formadas na reação de PEI com iodeto de *n*-butila.

Desde 1960, Klotz *et al*<sup>88</sup> já vinham estudando polímeros que tinham afinidades por pequenas moléculas, mas foi em 1971 que foi usado pela primeira vez o termo *synzymes*. Termo usado para polímeros sintéticos, como a polietilenoimina, que tinham atividade catalítica mimetizando as enzimas.

Aliás, os grupos amínicos da polietilenoimina podem atuar como nucleófilos e além disso, quando derivatizados com grupos alquílicos alifáticos promovem um microambiente apolar próximo aos grupos nucleofílicos produzindo um verdadeiro catalisador similar às enzimas.<sup>24</sup>

#### 1.2.5.3 Enzimas Artificiais a partir de Polietilenoimina Derivatizada

Para melhor avaliar a efetividade da polietilenoimina como um modelo de enzima hidrolítica, foi estudada a clivagem de ésteres de *p*-nitrofenila utilizando-se



diferentes polímeros amínicos e foram comparados com a polietilenoimina derivatizada com grupos dodeclicos. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

O que se observa é uma diminuição nas velocidades de reação de hidrólise a medida que vai se aumentando a cadeia alquílica dos ésteres (acetil, capril e lauril) tanto para a propilamina como para as polietilenoiminas de diferentes massas molares. Porém, há um aumento nas velocidades com o aumento das massas molares de polietilenoimina se comparado com as velocidades de clivagem hidrolítica da propilamina. O que mais surpreende são as velocidades de reação para a polietilenoimina derivatizada com grupos dodecil. As constantes de velocidades são altas comparadas à propilamina e às polietilenoiminas e aumenta conforme a cadeia alquílica dos ésteres. O que se pode concluir que a derivatização da polietilenoimina leva a um catalisador mais eficiente.

Grupos nucleofílicos também são usados na geração de *synzymes* com polietilenoimina.

**Tabela 3.** Constantes de primeira ordem para a acilação de grupos amínicos por ésteres de *p*-nitrofenila\*. <sup>39</sup>

Amina	acetato de <i>p</i> -nitrofenila $k_{cat} \times 10^2$ , min	caproato de <i>p</i> -nitrofenila $k_{cat} \times 10^2$ , min	laurato de <i>p</i> -nitrofenila $k_{cat} \times 10^2$ , min
Propilamina	0,98	0,51	0,053
PEI-600 Da	3,60	1,47	0,11
PEI-1800 Da	4,38	1,57	0,11
PEI-60000 Da	4,60	1,80	0,17
PEI-600 Da (10% derivatizado com lauril)	15,2	68,1	698

\* Tampão TRIS; pH 9,0 a 25 °C.

O imidazol, por exemplo, é bem conhecido por ser catalisador na hidrólise de ésteres de nitrofenila. Quando a polietilenoimina é derivatizada com o grupo imidazol – o metilenoimidazol, por exemplo – e grupos dodecílicos, forma uma *synzyme* 10% dodecilada com 15% de grupos imidazol tornando-se um catalisador 300 vezes mais efetivo do que o próprio imidazol na forma livre na hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Efetividade catalítica relativa na clivagem de acetato de *p*-nitrofenila.<sup>40</sup>

Catalisador	“Constante catalítica” ( $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ )*
Imidazol	10
$\alpha$ -Quimotripsina	10000
PEI-600 Da (10% derivatizado com dodecil e 15% imidazol)	2700

\* Medidas em pH próximo da neutralidade.

Como observado na Tabela 4, a *synzyme* apenas não tem uma efetividade catalítica maior se comparada com a enzima natural, a  $\alpha$ -quimotripsina.

Muitos outros catalisadores têm sido construídos utilizando-se como base a polietilenoimina derivatizada,<sup>30,32,33</sup> sendo que uma recente ferramenta na construção de PEIs funcionalizadas é a Química Combinatorial.

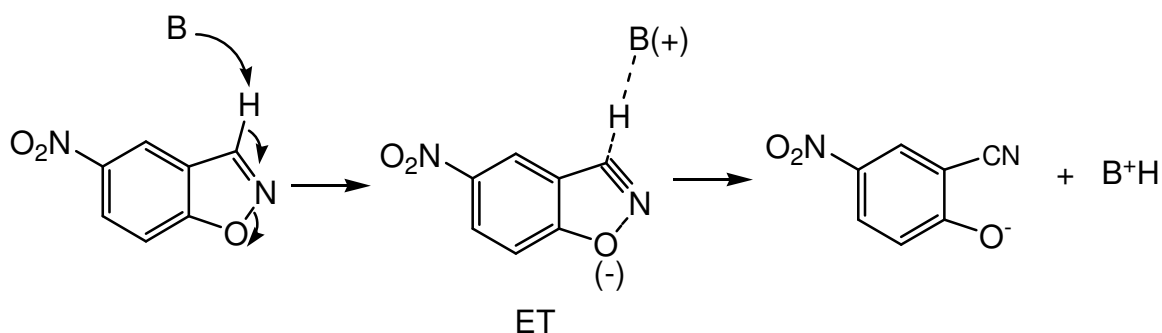
#### 1.2.5.4 Química Combinatorial

Os conceitos da química combinatorial foram inventados por um químico inorgânico nos anos 70 na procura de novos supercondutores,<sup>45</sup> mas somente no final dos anos 80 teve sua aplicação de forma mais intensa. Essa “nova ferramenta” é um método inovador na síntese simultânea de várias substâncias diferentes. Contrasta com métodos tradicionais, que levariam muito tempo na construção de tantos compostos individualmente e que a química combinatoria se propõe a fazer em um tempo mais curto. Muitos campos da química têm usado

esse novo método, tais como os campos de semicondutores, polímeros e principalmente os catalisadores.<sup>46</sup>

A construção de polímeros catalíticos é mais conhecida como síntese paralela. Nesse caso todos os compostos são produzidos em separado, mas ao mesmo tempo. Geralmente são produzidos em pratos com 96 cavidades individuais.

Utilizando-se desse método, Hollfelder *et al*,<sup>41</sup> derivatizaram o PEI com grupos dodecilantes, metilantes e benzilantes de forma combinatorial e estudaram esses polímeros na catálise da reação de eliminação de Kemp, Esquema 7. Este modelo é usado para a transferência de próton a partir de carbono, o que é peça chave em muitos sistemas biológicos.

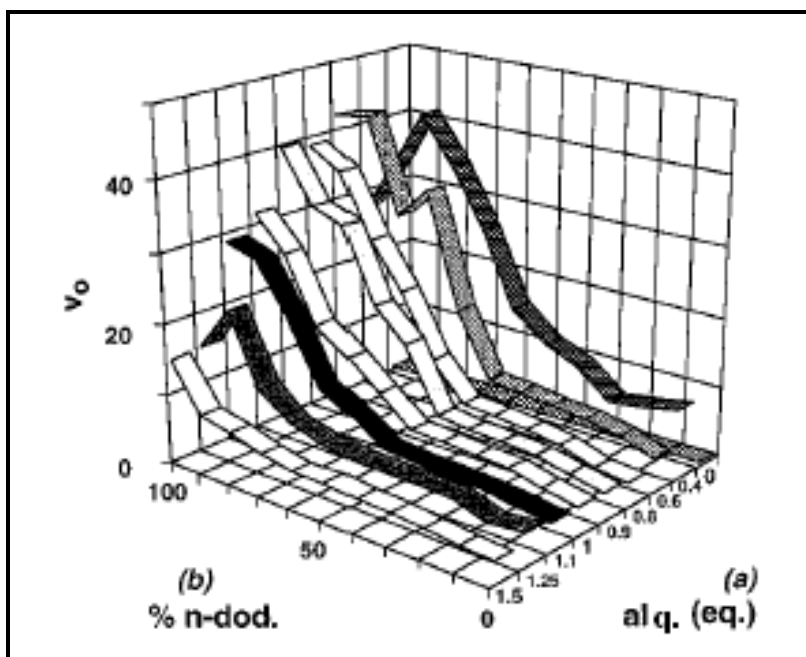


**Esquema 7.** Clivagem eliminativa de benzisoxazol: a eliminação de Kemp.<sup>41</sup>

Os polímeros derivatizados, nesse caso, catalisam a reação em uma velocidade de reação de magnitude de até  $10^6$  vezes comparado à reação espontânea em água e pelo menos 1000 *turnovers* por sítio catalítico e dessa forma fornecem um gráfico de velocidade *versus* o grau de alquilação em 3D, Figura 14.

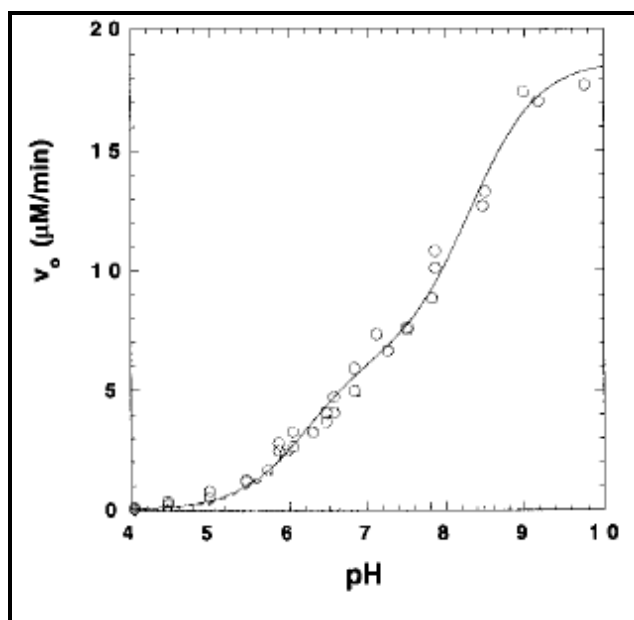
Os polímeros de maior efetividade catalítica, foram selecionados e testados segundo modelos de Michaelis-Menten.

As constantes catalíticas,  $k_{cat}$ , encontradas variaram entre 25 a  $370 \text{ min}^{-1}$  e os valores de  $K_M$  são na faixa milimolar.



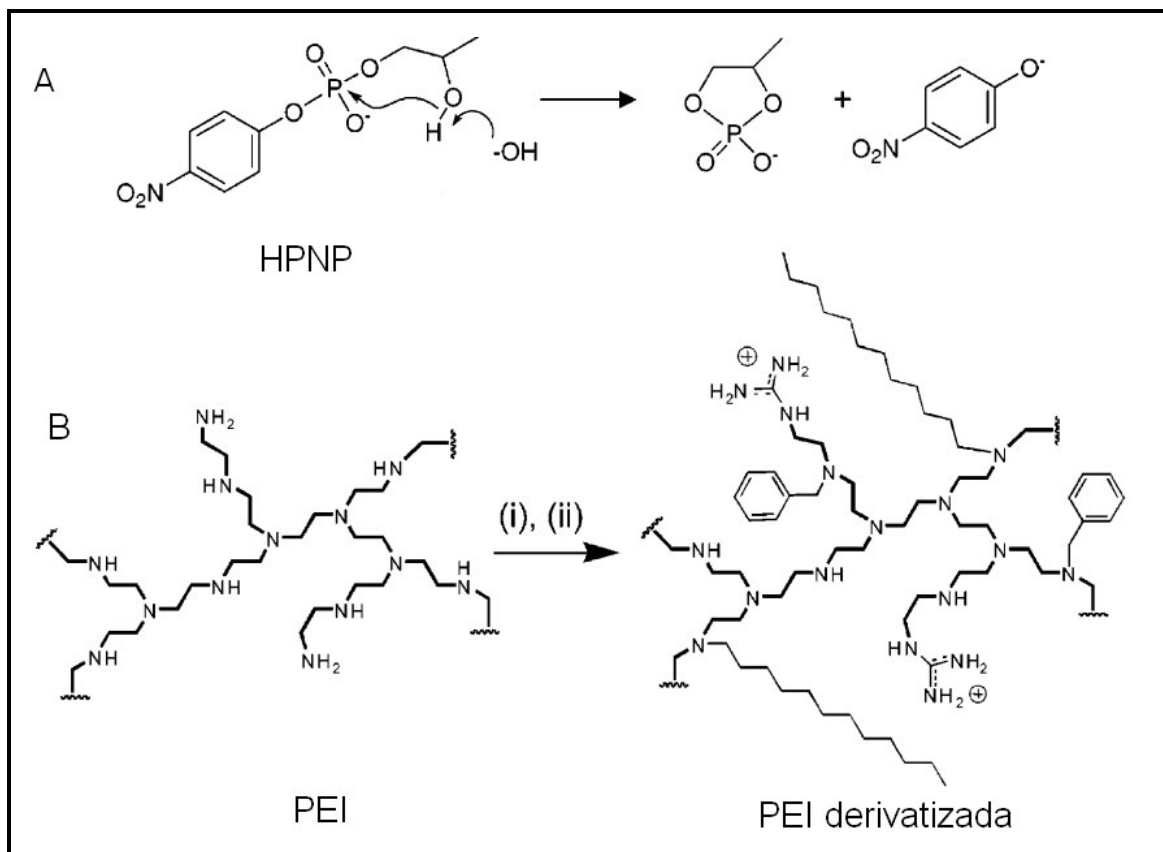
**Figura 14.** Velocidades iniciais graficadas contra a) os graus de alquilação (brometo de benzila mais iodeto de dodecila) de polietilenoimina e b) porcentagem de iodeto de dodecila nessa mistura.

Além disso, a dependência de pH sobre a catálise, mostrou que as espécies catalíticas estavam na forma básica e com diferentes valores de  $pK_a$  envolvidos, como mostra a Figura 15.



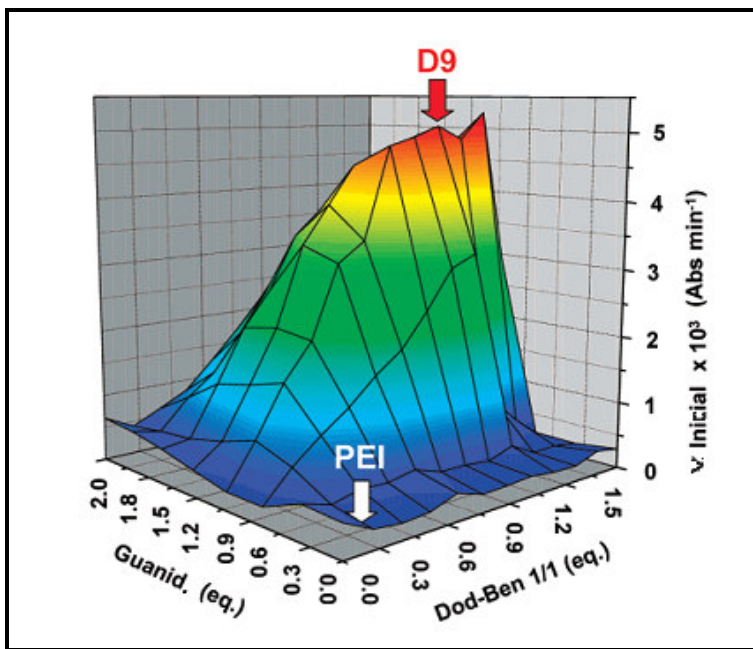
**Figura 15.** Perfil de pH para a catálise da eliminação de Kemp (adaptado).

Já Avenier *et al.*<sup>42</sup> utilizando do mesmo método, derivatizaram o PEI com grupos dodecil, benzil e com praxadina (1*H*-pirazol-1-carboxamidine hidrocloreto), Figura 16b, e estudaram a catálise sobre a reação de trans esterificação intramolecular de fosfato 2-hidroxipropil de *p*-nitrofenila (HPNP), Figura 16a.



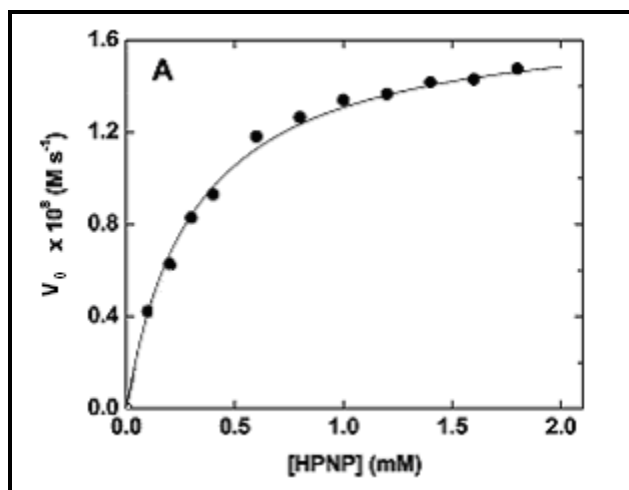
**Figura 16.** A) Reação de trans esterificação intermolecular de HPNP. B) Derivatização de PEI utilizando i) praxadina e ii) iodeto de dodecila e brometo de benzila.

As 96 combinações de PEI derivatizado, que catalisam a reação, forneceram o gráfico apresentado na Figura 17, onde as constantes de velocidades estão em função do grau de alquilação e guanidilação do polímero.



**Figura 17.** Gráfico em 3D das velocidades iniciais em função dos graus de alquilação (brometo de benzila mais iodeto de dodecila) e guanidilação (praxadina) da PEI. O polímero mais efetivo foi o D9. [synzyme] = 3,0  $\mu\text{M}$ , [HPNP] = 1,0 mM, pH 8,0 a 30  $^{\circ}\text{C}$ .

O perfil de velocidade da reação, onde se observa a saturação da synzymes pela concentração de substrato é típico de enzimas, assim como, observado na Figura 18.



**Figura 18.** Gráfico de velocidades iniciais *versus* concentração de substrato mostrando comportamento típico de saturação conforme Michaelis-Menten (adaptado). [D9] = 3,44  $\mu\text{M}$ , [HPNP] = 0-2 mM, pH 7,85 a 30  $^{\circ}\text{C}$ .

Desse gráfico podem ser obtidos os valores de  $K_M$ , que para a *synzyme* mais eficiente (D9) foi de 0,25 mM e o  $k_{cat}$  que foi de  $84 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Além disso, tal *synzyme* possui uma proficiência catalítica  $[(k_{cat}/K_M / k_{\text{não-catalisado}})]$  de  $1,80 \times 10^8$ , valor que se destaca entre os já reportados na literatura para a reação de clivagem de HPNP sem a presença de metais.

Dessa forma, observa-se como a química combinatorial, utilizando polímeros sintéticos, pode ser uma ferramenta de grande utilidade na construção de catalisadores que tenham um comportamento análogo às enzimas.

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

As enzimas possuem características únicas, porém, algumas delas possuem limitações para seu uso em catálise de processos químicos em laboratório, tais como: alta temperatura, variação de pH, instabilidade em solventes orgânicos entre outras. Por isso numerosas tentativas têm sido feitas para preparar polímeros sintéticos com atividade catalítica mimetizando as enzimas mas que não compartilhassem das mesmas limitações. Na procura de uma enzima hidrolítica artificial é que este trabalho está fundamentado, utilizando-se de polímeros funcionalizados que neste caso é a polietilenoimina (PEI).

A polietilenoimina é um polímero que tem sido bastante utilizado na construção de enzimas artificiais, principalmente por suas vantagens: é um polímero compacto, altamente ramificado, solúvel em água e possui grupos amínicos, que podem ser tanto derivatizados ou atuar como componentes catalíticos em reações hidrolíticas.

Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho é a construção de uma enzima artificial a partir da derivatização da polietilenoimina e caracterizá-la como tal através de modelos já conhecidos de comportamento enzimático como o de Michaelis-Menten.



## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Derivatizar a polietilenoimina com grupos alquilantes e acetilantes de forma combinatorial;
- ✓ Testar a atividade catalítica desses polímeros derivatizados através de métodos espectrofotométricos na hidrólise de acetato de *p*-nitrofenila (pNPA);
- ✓ Identificar os polímeros de melhor atividade catalítica;
- ✓ Determinar parâmetros cinéticos mais detalhados dos polímeros mais eficientes;
- ✓ Determinar os valores de  $pK_a$  aparentes de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise de pNPA;
- ✓ Caracterizar cineticamente o efeito sinérgico entre os grupos derivatizantes adicionados aos polímeros analisados;
- ✓ Caracterizar os polímeros mais eficientes como modelos de enzimas artificiais através de comparações de dados cinéticos com outras enzimas naturais e artificiais;

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

O polímero utilizado nas derivatizações foi o polietilenoimina (PEI) de massa molar 25 kDa (Aldrich). Para derivatização do polímero foram utilizados: 2,6-lutidina (Fluka),  $\alpha$ -bromo *tert*-butilacetato (Sigma-Aldrich), iodeto de metila (Alfa Aesar), brometo de benzila (Fluka), brometo de dodecila (Aldrich) e como solvente a dimetil formamida (DMF) (F. Maia) sem purificação prévia.

O substrato utilizado nos estudos de mapeamento cinético foi o acetato de *p*-nitrofenila (pNPA), sintetizado conforme descrito na literatura.<sup>43,44</sup> Uma solução estoque do pNPA, em acetonitrila de pureza 99,9% (Carlo Erba), foi usada nos experimentos para a determinação das constantes de velocidade observadas. Os tampões utilizados foram o TRIS (Trizma da Fluka) para pH entre 7 e 9,3 e carbonato de sódio (F. Maia) para pH entre 9,3 e 9,5. Para ajuste dos tampões foram utilizados soluções diluídas de ácido clorídrico (F. Maia) e hidróxido de sódio (Aldrich).

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para os estudos cinéticos foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard modelo 8452A acoplado a um banho termostatizado com celas de quartzo de 1 e 2 mL e caminho óptico de 1 cm.

Para as preparações dos polímeros derivatizados combinatorialmente foram utilizadas micro-placas de 2 mL (Axigen) com 96 cavidades. Para a transferência das soluções para as micro-placas foram utilizadas micropipetas de 12 canais (HTL) de 5-50 e 50-300  $\mu$ L.

### 3.3 PREPARAÇÃO DE POLIETILENOIMINA DERIVATIZADA

#### 3.3.1 Soluções

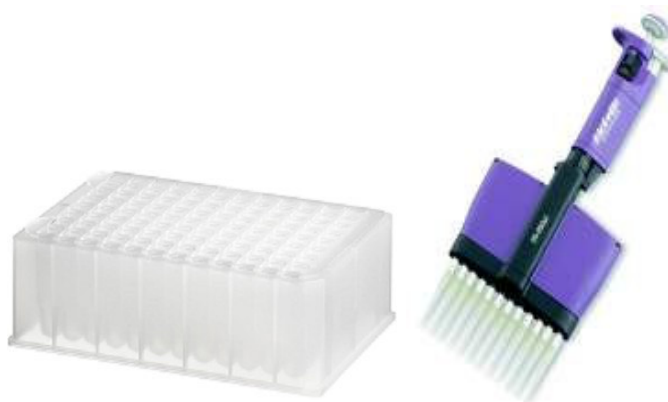
Em DMF foram dissolvidos a polietilenoimina para fornecer uma solução 0,822 mM (0,467 M em resíduos de monômero) e adicionado 2,6-lutidina em uma concentração 4 vezes maior que os resíduos de monômeros do polímero ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2^-$ ), 1,86 M.

Para as soluções dos reagentes alquilantes foram preparadas soluções estoques de iodeto de metila, brometo de dodecila e brometo de benzila em DMF para se obter uma concentração de 1,05 M para cada solução.

Para o agente acetilante, o acetato de  $\alpha$ -bromo *tert*-butila foi dissolvido também em DMF para ser obtida uma solução 0,93 M.

#### 3.3.2 Metodologia para Derivatização Combinatorial da Polietilenoimina

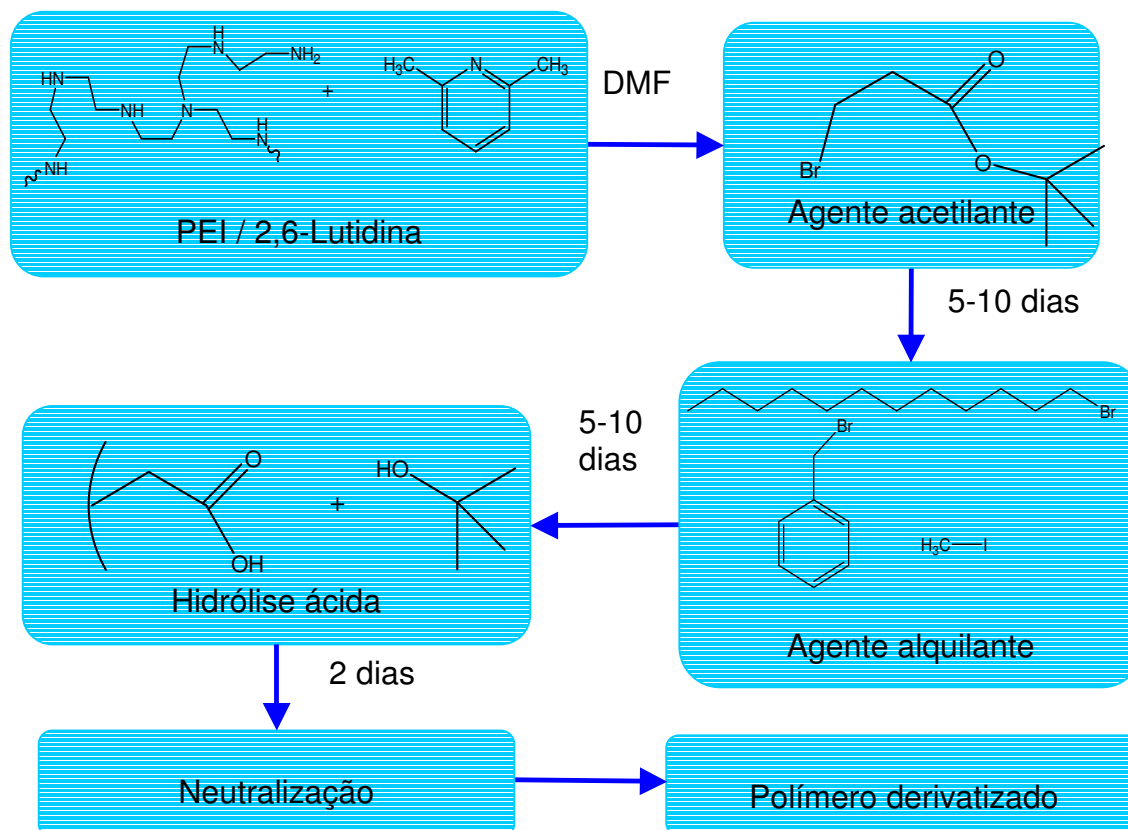
Como modelo para a derivatização do polietilenoimina, Gesser<sup>47</sup> estudou a reação entre o  $\alpha$ -bromoacetato de etila e a dietilenotriamina para analisar o comportamento do PEI frente a uma reação de acetilação. Os resultados forneceram dados que permitiram construir o método para a acetilação do PEI. Para a preparação dos polímeros foi usado o método de funcionalização combinatorial. Utilizou-se micro-placas de 96 cavidades e micropipetas de 12 canais, para a transferência dos reagentes e solventes, Figura 19.



**Figura 19.** Micro-placas de 2 mL e micropipeta de 12 canais.

Dessa forma, combinaram-se reagentes acetilantes com os alquilantes de forma a obter diferentes polímeros derivatizados com diferentes graus de acetilação-alquilação. Foram produzidas 3 bibliotecas com diferentes combinações: acetilação-dodecilação **(1)**, acetilação-benzilação **(2)** e acetilação-metilação **(3)**.

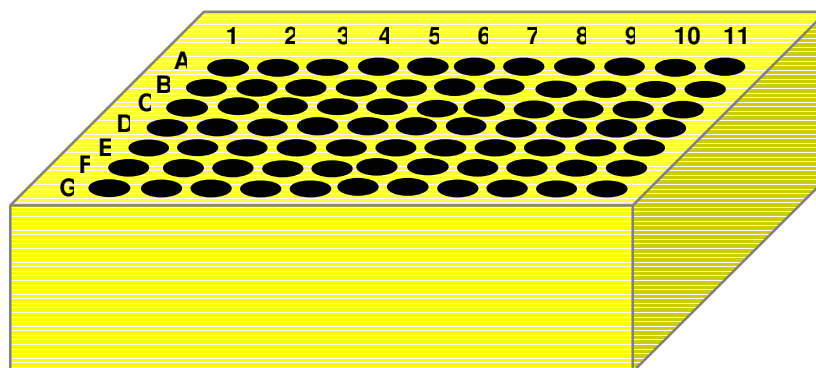
A metodologia seguida está descrita na Figura 20.



**Figura 20.** Metodologia para a derivatização do polímero.

Primeiramente é adicionado 600  $\mu\text{L}$  de solução PEI/2,6-lutidina (0,822 mM/1,860 M) em todas as cavidades da micro-placa representada na Figura 21.

Foi adicionado DMF suficiente para ser obtida uma concentração final de polímero de 0,308 mM (175 mM em resíduos de monômero), a qual é constante para todas as cavidades da micro-placa ao contrário dos reagentes derivatizantes.



**Figura 21.** Representação da micro-placa para identificação das combinações de derivatização de polietileoimina.

O reagente acetilante foi adicionado aos poços das linhas A-G e o agente alquilante aos poços das colunas 1-11, em concentrações variadas conforme o número de equivalentes para o protocolo mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Número de equivalentes de agente acetilante para as cavidades de A-G e agente alquilante para as cavidades que variam de 1-11.

		ALQUILAÇÃO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ACETILAÇÃO	A	0,0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	1,05	1,20	1,30	1,40
	B	0,3										
	C	0,6										
	D	0,9										
	E	1,2										
	F	1,5										
	G	1,8										

Por exemplo, todas as 11 cavidades da micro-placa referentes à linha B receberam uma quantidade de reagente acetilante suficiente para fornecer soluções com 0,3 equivalentes e as 7 cavidades referentes ao coluna 2 receberam quantidades suficientes para se obter soluções com 0,15 equivalentes de reagente alquilante e assim por diante. Na cavidade B2 tem-se 1,6  $\mu$ L de solução de polietilenoimina 0,308 mM em DMF contendo 0,3 equivalentes de agente acetilante e 0,15 equivalentes de agente alquilante, por exemplo.

Seguindo a metodologia, primeiro foram adicionados os agentes acetilantes cujas concentrações se referem aos equivalentes mostrados na Tabela 6. A quantidade molar do reagente acetilante considera que até dois grupos possam derivatizar um mesmo nitrogênio amínico do polímero (quando primários). Além do mais, uma derivatização exaustiva também é considerada. Sendo assim, até 2 mol do reagente pode ser usado. Neste trabalho foi usado apenas até 1,8 mol.

**Tabela 6.** Protocolo para concentração de agente acetilante nas bibliotecas.

	<sup>a</sup> Equiv. Molar $\alpha$ -Br (mmol)	$\alpha$ -Br (mol)	<sup>b</sup> M <sub>f</sub> $\alpha$ -Br (M)
<b>A</b>	0,0	0,0	0,0
<b>B</b>	0,3	0,084	0,052
<b>C</b>	0,6	0,168	0,105
<b>D</b>	0,9	0,252	0,158
<b>E</b>	1,2	0,336	0,210
<b>F</b>	1,5	0,420	0,263
<b>G</b>	1,8	0,504	0,315

<sup>a</sup>número de equivalentes molares de  $\alpha$ -Br em um volume final de 1,6 mL considerando 0,28 mmol de aminas livres no polímero; <sup>b</sup> concentração de reagente para um volume final de 1,6 mL.

Após cinco a dez dias é adicionado o reagente alquilante, sendo o brometo de dodecila para a micro-placa **(1)**, brometo de benzila para a micro-placa **(2)** e iodeto de metila para a **(3)**. As adições são feitas seguindo o protocolo da Tabela 7, onde variaram-se as quantidades de reagentes de 0 a 1,4 mol, seguindo a numeração de 1 a 11 da micro-placa. Para completar o volume final de 1,6 mL foi adicionado DMF sempre com agitação ocasional.

Após 5-10 dias foi feita a hidrólise do polímero derivatizado, com ácido clorídrico 50 mM, para liberar o grupo *tert*-butila do acetil ligado à cadeia polimérica.

**Tabela 7.** Protocolo para concentração de agente alquilante nas bibliotecas.

	<sup>a</sup> Eq. molar alquilante (mmol)	Reagente alquilante (mol)	<sup>b</sup> M <sub>f alq.</sub> (M)
<b>1</b>	0,0	0,0	0,0
<b>2</b>	0,15	0,042	0,026
<b>3</b>	0,30	0,084	0,052
<b>4</b>	0,45	0,126	0,080
<b>5</b>	0,60	0,168	0,105
<b>6</b>	0,75	0,210	0,131
<b>7</b>	0,90	0,252	0,158
<b>8</b>	1,05	0,294	0,184
<b>9</b>	1,20	0,336	0,210
<b>10</b>	1,30	0,364	0,228
<b>11</b>	1,40	0,392	0,245

<sup>a</sup> números de equivalentes molares de alquilante em um volume final de 1,6 mL considerando 0.28 mmol de aminas livres no polímero. <sup>b</sup> concentração de reagente para um volume final de 1.6 mL.

Após dois dias foi feita a neutralização com hidróxido de sódio 50 mM. Para isso foram retirados 774 µL de solução de cada micro-placa e transferidos para novas micro-placas. Foram feitas as hidrólises com 300 µL de ácido e a neutralizações com 240 µL de base respectivas a cada micro-placa e adicionados DMF para completar a solução a 1,5 mL. Assim, a polietilenoimina derivatizada foi obtida com concentração final de 159 µM (9,63 mM em resíduos de monômero) em todas as micro-placas estando aptas para serem utilizados nos estudos cinéticos.

### 3.4 ESTUDOS CINÉTICOS

As cinéticas foram monitoradas através da formação do *p*-nitrofenolato em 404 nm, onde há uma maior absorção do substrato, usando uma solução aquosa tamponada em pH 7,4, a 35 °C, com soluções 50 mM do tampão necessário. O

mapeamento cinético das micro-placas foi necessário como parte do protocolo cinético evolucionário para identificar os polímeros mais efetivos em cada biblioteca. Os polímeros selecionados foram testados segundo modelos de Michaelis-Menten. Utilizando este procedimento, foram avaliadas as influências do pH e da concentração do substrato.

### 3.4.1 Detecção dos Polímeros mais Efetivos

Para detectar os polímeros derivatizados com uma maior efetividade catalítica, foram testados os polímeros de cada uma das três bibliotecas na hidrólise de acetato de *p*-nitrofenila sob cinética em condições de primeira ordem.

Foram adicionados 5,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque do polímero derivatizado, de modo que sua concentração final na cubeta fosse 0,40  $\mu\text{M}$  (232  $\mu\text{M}$  de unidades monoméricas), em 1919  $\mu\text{L}$  de solução tampão TRIS 50 mM, pH 7,40 e 26,0  $\mu\text{L}$  de solução estoque de pNPA 3 mM para obter uma concentração final na cubeta de 40,0  $\mu\text{M}$  contendo 1,33 % de acetonitrila a 35 °C, levando em média 8 h para completa formação do produto.

### 3.4.2 Perfil de pH

Para os polímeros derivatizados com melhores comportamentos catalíticos foram feitos os perfis de pH e outros estudos cinéticos.

Os perfis de pH foram construídos na faixa de pH de 7,0-9,5. Foram adicionados 5,0  $\mu\text{L}$  de polímero derivatizado, para uma concentração final na cubeta de 0,40  $\mu\text{M}$  (232  $\mu\text{M}$  de unidades monoméricas), em 1930  $\mu\text{L}$  de solução tampão TRIS 50 mM, pH 7,4. A esta solução foram adicionados 16,0  $\mu\text{L}$  de solução estoque de pNPA 16,2 mM pra uma concentração final na cubeta de 133  $\mu\text{M}$  contendo 0,82 % de acetonitrila e a uma temperatura de 35 °C.



### 3.4.3 Obtenção de Parâmetros Cinéticos de Michaelis-Menten

A obtenção dos parâmetros cinéticos dos polímeros derivatizados para caracterização dos mesmos como enzimas foi feita com a variação da concentração de substrato em excesso, mantendo-se fixa a concentração de *synzyme*, além da concentração de tampão a 50 mM em pH 7,76, temperatura a 35 °C e utilizado o método das velocidades iniciais acompanhando-se 10% das reações.

#### 3.4.3.1 Variação da Concentração de Substrato

Para a variação da concentração de substrato, foram adicionados à cubeta de 1 mL um volume de 5 µL de polímero derivatizado para uma concentração final de 0,8 µM em solução tampão 50 mM. Os volumes de substratos adicionados, a partir de uma solução estoque 16,2 mM, foram de 6 a 180 µL variando-se de  $9,92 \times 10^{-5}$  a  $2,98 \times 10^{-3}$  M de concentração final na cubeta. Para cada concentração de substrato foi também variado o pH. Variaram-se os pH de 7 a 9,4 com temperatura mantida fixa a 35 °C para obtenção dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten para cada um dos pH estudados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DERIVATIZAÇÃO DA POLIETILENOIMINA

A presença de grupamentos amínicos na estrutura carbônica da polietilenoimina (PEI) está entre os principais fatores que colocam este polímero como os mais importantes na síntese de enzimas artificiais. A potencialidade nucleofílica de seus distintos grupos aminos é ponto estratégico para sua funcionalização e planejamento da inserção de novos grupamentos funcionais que compõem o sítio ativo de uma enzima natural.

Para a construção de enzimas artificiais a partir de polímeros, alguns grupos funcionais ligados à cadeia polimérica podem ser necessários para a promoção de reações que as enzimas naturais também promovem. Nas enzimas naturais, por exemplo, o bolso hidrofóbico que envolve o sítio ativo da enzima é de grande importância, pois é lá que o substrato é associado e os grupos catalíticos das enzimas geram a catálise. Dessa forma, como princípio para a geração de microambientes hidrofóbicos, grupos apolares são aderidos ao polímero. Com esse intuito, grupos dodecílicos, benzílicos e metílicos são inseridos independentemente nos polímeros e o efeito de cada um foi analisado nesse trabalho. Já o grupo acetil tem o intuito de fornecer grupamentos funcionais ao polímero capazes de promover a cisão da ligação éster e um conseqüente aumento de velocidade da reação.

Neste projeto, a derivatização da polietilenoimina a partir da inserção de grupos funcionais na cadeia polimérica, foi feita pelo método de funcionalização combinatorial em micro-placas de 96 poços. A produção de polímeros derivatizados por este método gerou três bibliotecas distintas com diferentes combinações estequiométricas para o agente acetilante e para o alquilante: **(1)** polietilenoimina derivatizada com acetato de  $\alpha$ -bromo *tert*-butila e brometo de dodecila; **(2)** polietilenoimina derivatizada com acetato de  $\alpha$ -bromo *tert*-butila e brometo de benzila; **(3)** polietilenoimina derivatizada com acetato de  $\alpha$ -bromo *tert*-butila e iodeto de metila.

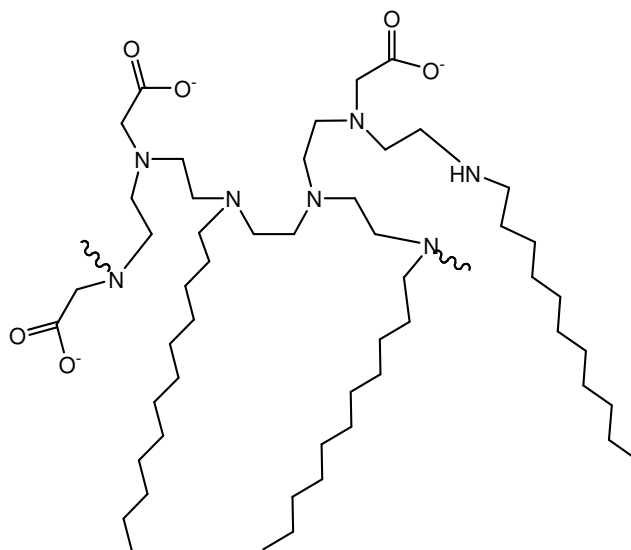
Embora a caracterização dos novos polímeros gerados em cada uma das três bibliotecas não tenha sido objeto deste projeto, Johson e Klotz<sup>29</sup> detectaram, por RMN de hidrogênio, que as amins primárias e secundárias livres no polímero foram acetiladas em até 70% quando 1,3 equivalente de anidrido acético foi utilizado como agente derivatizante. Além disso, cerca de 40% de amins primárias e secundárias de PEI foram alquiladas quando utilizado 0,22 equivalente de iodeto de *n*-butila. Sabe-se também que a reação do acetato de  $\alpha$ -bromo *t*-butila com a dietilenotriamina, idealizada como modelo do processo de acetilação, produz a acetilação de amins secundárias e a monoacetilação de amins primárias livres no polímero.<sup>47</sup>

Dessa forma, é esperado que a biblioteca **(1)** contenha polímeros derivatizados contendo uma combinação de grupos acetilantes e dodecilantes, conforme exemplo Figura 22A, assim como no caso da biblioteca **(2)** contendo polímeros derivatizados combinados com grupos acetilantes e benzilantes, Figura 22B, enquanto a **(3)** combinados com grupos acetilantes e metilantes, Figura 22C.

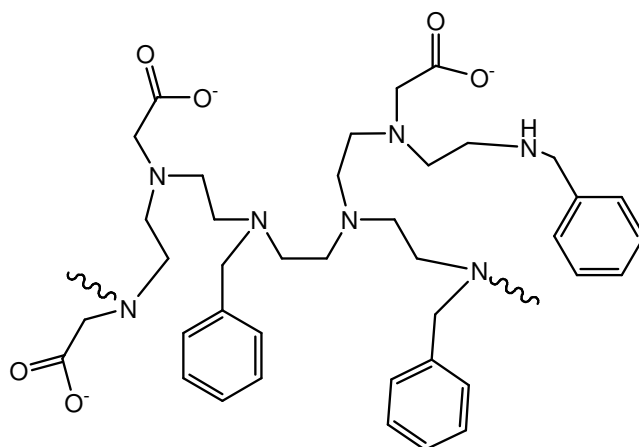
As combinações geradas para cada cavidade das bibliotecas constituem uma mistura de inúmeras combinações de amins primárias, secundárias e terciárias funcionalizadas. Sendo assim, seria difícil identificar qual combinação é a dominante. Porém, fazendo uma breve comparação com os dados de Johnson e Klotz<sup>29</sup> discutidos anteriormente, quando o PEI foi derivatizado com grupos acetilantes em até 1,8 equivalente, neste trabalho, 70% dos grupos amínicos também podem ter sido funcionalizados, assim como para a derivatização feita por Johnson, enquanto em concentrações máximas de reagentes alquilantes cerca de 40% podem ter formado ligações covalentes com os nitrogênios da cadeia polimérica.

No caso dos grupos alquilantes, um valor até acima disso pode ter formado, porque quando derivatizado com um grupo apolar maior, que foi o grupo dodecila, o sítio hidrofóbico formado na cadeia polimérica pode favorecer a formação de ligação entre um grupo amino vizinho e um outro grupo alquílico pelo efeito hidrofóbico criado.

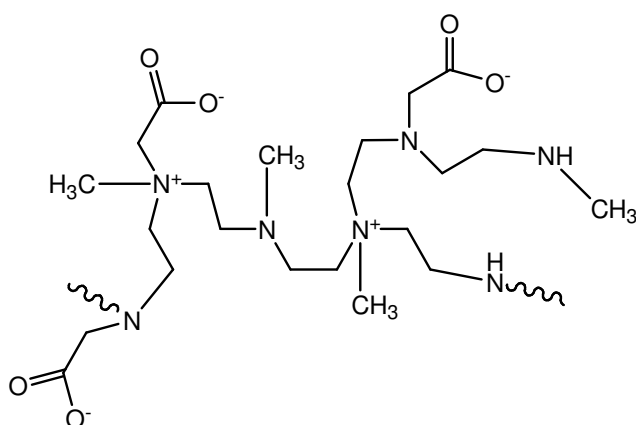
A



B



C



**Figura 22.** Exemplo de polietilenoiminas derivatizadas com reagentes acetilantes e (A) dodecilante, (B) benzilante e (C) metilante.

## 4.2 MAPEAMENTO CINÉTICO DAS BIBLIOTECAS

### 4.2.1 Acetilação e dodecilação – Biblioteca 1

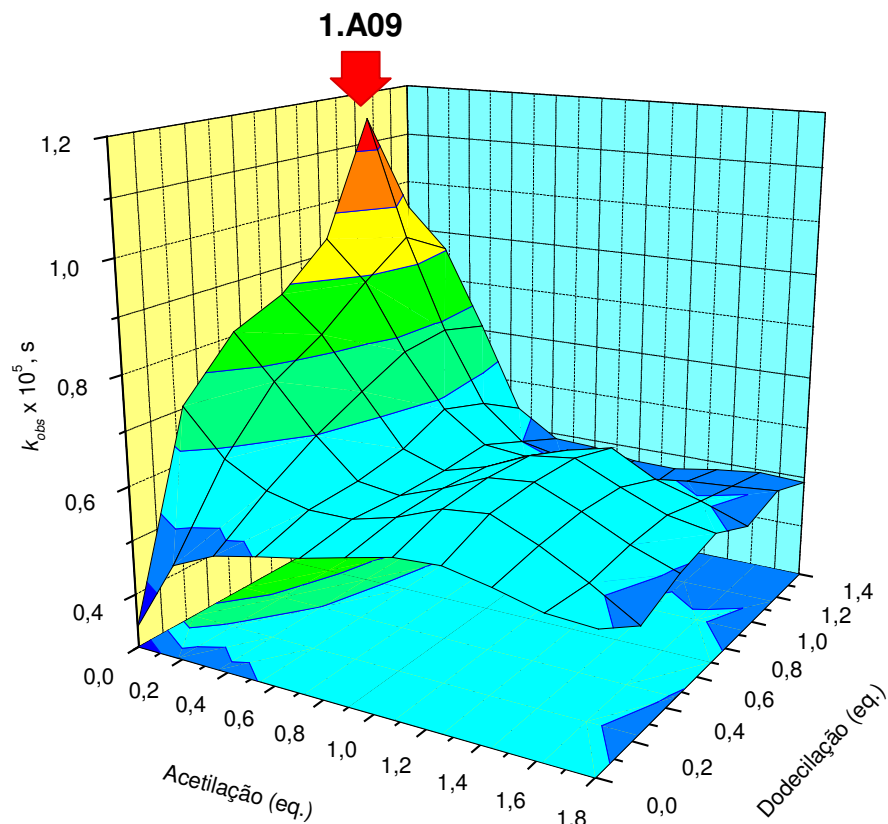
Ao contrário da natureza, que estabeleceu critérios para a seleção do mais apto no processo evolucionário das enzimas naturais; o processo de evolução para as enzimas artificiais está baseado na seleção do mais rápido. Assim, uma varredura de cada uma das três bibliotecas geradas, feita a partir do estudo da cinética da reação entre o polímero funcionalizado e o acetado de *p*-nitrofenila, permite a determinação da eficiência catalítica de cada uma das enzimas artificiais sintetizadas e a identificação do processo cinético evolucionário que deverá nortear, quando for o caso, novas modificações estruturais para a enzima artificial.

As constantes de velocidades de primeira ordem foram obtidas para cada combinação de equivalentes de agentes alquilantes e acetilantes em cada cavidade das micro-placas. Assim, os resultados obtidos para cada biblioteca geraram gráficos de  $k_{obs}$  pelo grau de acetilação e grau de alquilação em três dimensões.

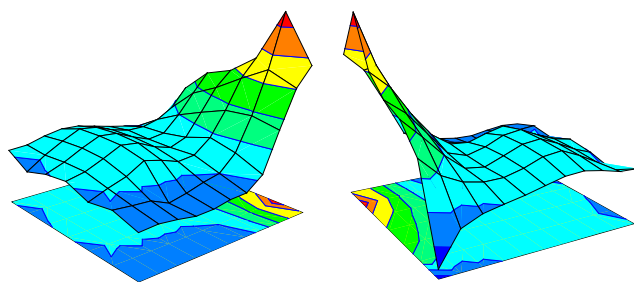
Para a biblioteca (1), onde foram combinados os grupos acetil e dodecil na derivatização de PEI, a Figura 23 resultante mostrou que o alto grau de dodecilação na cadeia polimérica é muito mais eficiente que quando o dodecil é combinado com o acetil ou até mesmo quando só grupos acetil estão ligados ao polímero. Assim, é possível deduzir que somente os grupos dodecila ligados ao polímero produzem um efeito capaz de hidrolisar o pNPA fornecendo o produto numa velocidade mais significativa. O polímero que apresentou melhor atividade catalítica na clivagem de pNPA foi o polímero identificado como **1.A09**, com uma combinação de dodecilação de 1,2 equivalente e nenhum equivalente de grupo acetila. A constante de velocidade quando utilizado este polímero foi  $1,20 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  em pH 7,4. Considerando que a constante de velocidade para a hidrólise do pNPA, na ausência do polímero em pH 7,0 é igual a  $1,5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ,<sup>24</sup> pode-se concluir que o processo com a participação do polímero **1.A09** é 800 vezes mais eficaz. Além disso, é cerca de 3,5 vezes maior que a velocidade de clivagem do

substrato pelo polímero não derivatizado que foi de  $3,38 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Já o polímero derivatizado com um alto grau de acetilação e nenhum equivalente de grupo dodecil, elemento **1.G01** da biblioteca, para o qual a constante de velocidade observada foi de  $5,43 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , é de 1,6 vez, aproximadamente, mais eficaz que o polímero não funcionalizado. Também foi observado que a adição de grupos acetilas ao polímero provocou um pequeno aumento nas constantes de velocidade, sendo de  $6,46 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , cerca de 1,9 vez maior comparado ao polímero não derivatizado, mas diminuindo para uma diferença de 1,5 vez, quando atingiu o número máximo de equivalentes. Por outro lado a combinação de um alto grau de grupos acetilas e um alto grau de grupos dodecila conduz a uma constante de velocidade de  $4,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , 1,5 vez maior que o polímero não derivatizado porém, 2,5 vezes menor que para o polímero mais eficiente.

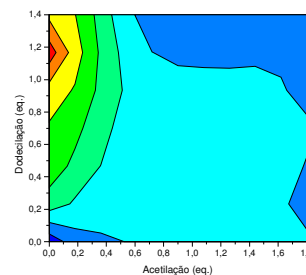
Embora a inserção de grupos acetilas na estrutura do polímero tenha sido planejada com o intuito de fornecer grupamentos funcionais capazes de promover a cisão da ligação éster e um conseqüente aumento de velocidade, no pH estudado os grupos carboxílicos, presentes na estrutura carbônica do polímero, estão em sua forma desprotonada e devem gerar um ambiente com alto teor de carga negativa; ambiente este que deve desestabilizar o estado de transição para a clivagem do éster. Por outro lado, o aumento de velocidade oriundo do aumento no grau de dodecilação do PEI gera um efeito hidrofóbico causado pela cadeia alquílica do grupo dodecila ligado ao polímero o que é, de certa forma, surpreendente. Sabe-se, como regra geral que solventes polares, próticos ou apróticos, devem aumentar a velocidade de clivagem de ésteres,<sup>48</sup> uma vez que o intermediário gerado durante o processo é carregado. Assim, o alto teor de agente dodecilante na estrutura polimérica deve ter formado um microambiente favorável, capaz de seqüestrar o substrato e aproximá-lo de uma molécula de água, favorecendo assim a hidrólise do pNPA independentemente dos grupos acetilas.



(a)



(b)



(c)

**Figura 23. (a):** Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes de brometo de dodecila e  $\alpha$ -bromoacetato de *t*-butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; **(b):** gráfico de **(a)** apresentado em diferentes perspectivas; **(c)** vista de topo. [pNPA]=40  $\mu$ M, [polímero]=0,4  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35  $^{\circ}$ C.

Outra possibilidade pode estar associada a maior nucleofilicidade dos grupamentos aminícos dodecilados, permitindo que estes possam promover a cisão do substrato via uma reação de aminólise de éster ou pela aproximação do substrato e algum nucleófilo constituinte do polímero no microambiente formado no PEI dodecilado.

#### 4.2.2 Acetilação e benzilação – Biblioteca 2

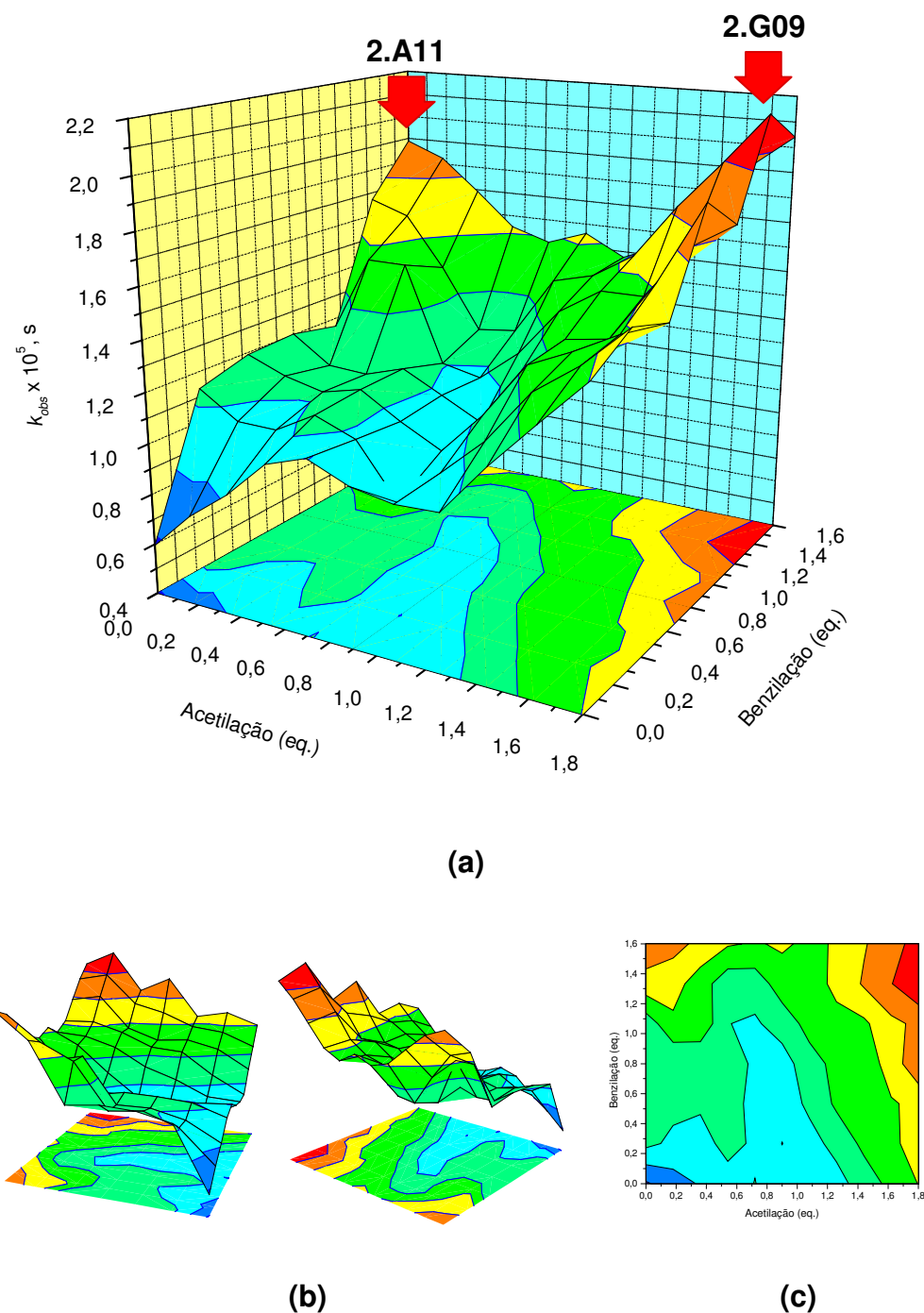
Para a biblioteca **(2)**, derivatizada com  $\alpha$ -bromoacetato de t-butila e brometo de benzila, o gráfico 3D da constante de velocidade observada *versus* grau de derivatização, apresenta duas regiões distintas detentoras de uma maior capacidade catalítica.

As duas regiões citadas são referentes a um alto grau de benzilação de um lado e de outro por um alto grau de benzilação combinado com alto grau de acetilação, Figura 24.

O polímero identificado como **2.A11**, caracterizado por apresentar um grau de benzilação de 1,4 equivalente e 0 equivalente de agente acetilante, apresenta uma constante de velocidade para a clivagem do pNPA de  $1,98 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . O polímero **2.G09** contendo 1,2 equivalente de reagente benzilante e 1,8 equivalente de reagente acetilante apresentou uma constante de velocidade de  $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para a clivagem do pNPA. Ambos apresentaram uma reatividade cerca de 3,5 vezes maior que a do polímero não derivatizado e mais de 1470 vezes se comparado com a velocidade de hidrólise do pNPA em meio aquoso em pH 7,0.

Nessa biblioteca já é observado o efeito do grupo acetila na cadeia polimérica na reação de clivagem do pNPA. Quando combinado com um alto grau de benzilação o efeito é bastante pronunciado. Isso significa que o efeito sinérgico entre esses dois agentes no polímero devem estar promovendo um efeito positivo sobre a coordenada de reação.



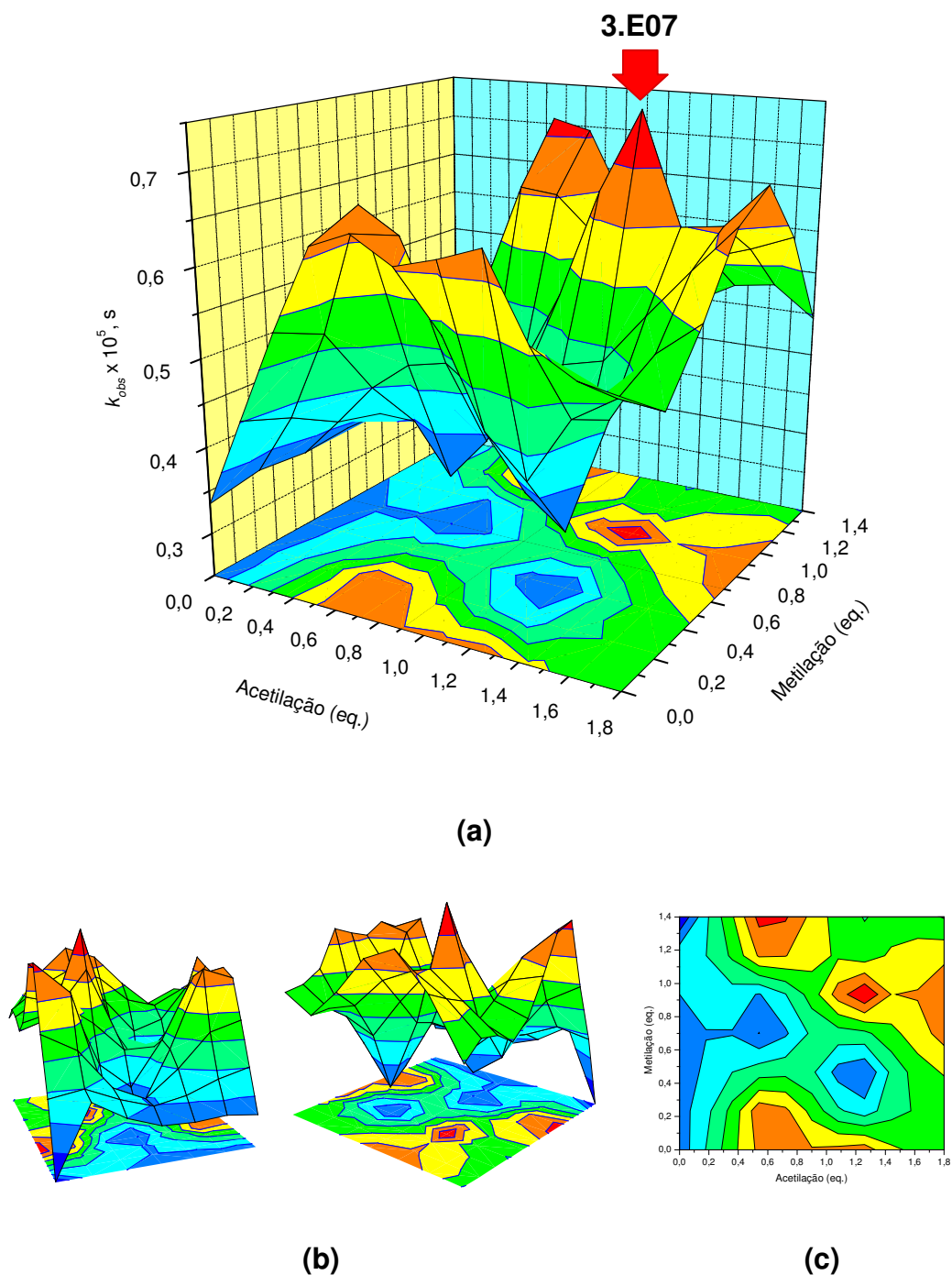


**Figura 24. (a):** Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes de brometo de benzila e  $\alpha$ -bromoacetato de *t*-butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; **(b):** gráfico de **(a)** apresentado em diferentes perspectivas; **(c)** vista de topo. [pNPA]=40  $\mu$ M, [polímero]=0,4  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35  $^{\circ}$ C.

Quando é mantida fixa uma quantidade máxima de equivalentes de grupos benzílicos e é diminuído o grau de acetilação, há uma diminuição na atividade catalítica, mas é aumentada novamente quando os graus de acetilação chegam a zero. Portanto, o efeito sinérgico dos dois grupos só têm efeito positivo a partir de uma quantidade máxima de equivalentes de ambos os grupos. Diminuindo a quantidade de equivalentes de cada um, produz um efeito bem menos positivo a reação. Para Hollfelder *et al*,<sup>30</sup> que derivatizaram o PEI com brometo de benzila, iodeto de dodecila e iodeto de metila para estudar seu efeito catalítico sobre a eliminação de Kemp, o grupo benzila ligado ao polímero não aumentou necessariamente as velocidades de reação, mas aumentou significativamente a solubilidade do polímero derivatizado em água. Estes resultados sugerem que as constantes de velocidades maiores para os polímeros com um alto grau de benzilação, tanto o **2.A11** e **2.G09**, pode também ter sido resultado da maior solubilidade do PEI derivatizado em solução.

#### 4.2.3 Acetilação e metilação – Biblioteca 3

Como observado na Figura 25, na derivatização da PEI com agentes acetilantes e metilantes foram formados vários novos polímeros tendo eficiência na catálise da reação de clivagem do substrato estudado. Entre eles estão os polímeros: **3.C03**, **3.C11**, **3.E01** e **3.E07**. O polímero **3.C03** foi derivatizado com uma combinação de 0,6 equivalente de reagente acetilante e 0,3 equivalente de reagente metilante; **3.C11** combinado com 0,6 equivalente de grupo acetilante e 1,4 de metilante; **3.E01** derivatizado por 1,2 equivalente de acetil e nenhum equivalente de reagente metil; e por último o **3.E07** derivatizado com 1,2 equivalente de reagente acetilante e 0,9 de reagente metilante. Foi observado que nesse caso os grupos acetilas têm uma influência teoricamente maior sobre a catálise da reação de clivagem, como em **3.C03** e **3.E01** para os quais as constantes de velocidades observadas são  $7,33 \times 10^{-5}$  e  $7,46 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 25. (a):** Gráfico em 3D das constantes de velocidade de primeira ordem para a reação de hidrólise do pNPA em função do número de equivalentes brometo de metila e  $\alpha$ -bromoacetato de *t*-butila. Os pontos do gráfico representam as constantes de velocidade obtidas com os polímeros derivatizados distintos; **(b):** gráfico em **(a)** apresentado em diferentes perspectivas; **(c)** vista de topo. [pNPA]=40  $\mu$ M, [polímero]=0,4  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35  $^{\circ}$ C.

Mas na verdade, o que pode se perceber, é que nesse caso houve um efeito de inibição pelos grupos metilas na maior parte da biblioteca comparada às bibliotecas anteriores. A constituição dos polímeros derivatizados contendo apenas grupos acetilas de 0 - 1,8 equivalentes é essencialmente a mesma para todas as bibliotecas. Entre A01 a G01 são variadas apenas os equivalentes de grupos acetilas nas bibliotecas. E as agregações de grupos alquílicos (A02 a A11 e G02 a G11) aos polímeros praticamente aumentaram as efetividades catalíticas nas duas primeiras bibliotecas. Porém, para a terceira biblioteca houve uma diferença: a adição de grupos metilas provocou uma diminuição nas velocidades de reação em relação até mesmo do polímero não derivatizado que foi de  $3,35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Somente em algumas regiões com maior grau de metilação, como em **3.C11** e **3.E07**, as constantes de velocidades foram maiores,  $7,61 \times 10^{-5}$  e  $8,92 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  respectivamente, mas estes polímeros não foram tão mais efetivos comparadas aos contendo apenas grupos acetilas. As diferenças são pequenas, e só para **3.E07** obteve-se um resultado mais expressivo; com um aumento de reatividade de mais de 2,5 vezes comparado ao polímero não derivatizado e pouco mais de 590 vezes comparado à hidrólise de pNPA em meio aquoso. Os resultados de constante de velocidade de hidrólise do pNPA, usando as três bibliotecas, podem ser comparados na Tabela 8.

A Tabela 8 apresenta constantes de velocidades da mesma ordem de magnitude, independentemente da presença de grupamentos acetilas na estrutura do polímero. O conjunto de dados sugere que, se a acetilação contribui para o aumento da eficiência da reação de hidrólise como um todo, a participação do grupamento acetil deve ocorrer em uma etapa que precede a etapa determinante da velocidade; normalmente considerada, numa reação enzimática, a decomposição do complexo acil-enzima durante a formação do produto de reação.

**Tabela 8.** Comparação das constantes de velocidades entre os polímeros mais eficientes das três bibliotecas e os polímeros não derivatizados.

Polímero	Grau de acetilação (eq.)	Grau de alquilação (eq.)	$k_{obs}$ ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )*
<b>1.A09</b>	0	1,2	1,20
<b>1.A01</b>	0	0	0,34
<b>2.A11</b>	0	1,4	1,98
<b>2.G09</b>	1,8	1,2	2,21
<b>2.A01</b>	0	0	0,59
<b>3.E07</b>	1,2	0,9	0,89
<b>3.A01</b>	0	0	0,35

\*Tampão TRIS 50 mM, pH 7,4, 35 °C. [pNPA]=40  $\mu\text{M}$ , [polímero]=0,4  $\mu\text{M}$ . Hidrólise espontânea de pNPA em tampão 7,0 é de  $1,5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

Mesmo considerando-se a pequena diferença de reatividade entre as bibliotecas, de um modo geral, a que apresentou um melhor resultado para reação de clivagem do pNPA foi a biblioteca **(2)**. Nesse caso, foram combinados reagentes benzilantes e acetilantes. Dois polímeros apresentaram resultados mais satisfatórios, **2.A11** e **2.G09**, com constantes de velocidade de 1,98 e  $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  respectivamente; com velocidade até 2,5 vezes maior que o polímero **3.E07** para o qual a eficácia catalítica foi menor. Contudo, as pequenas diferenças observadas para as constantes de velocidade sugerem que os efeitos gerados pelos polímeros alquilados e acetilados são sutis. Porém é razoável propor que: i) a inserção de cadeias alquílicas longas permite um maior enovelamento do polímero capaz de gerar cavidades onde a reação pode ocorrer em um microambiente similar ao da enzima natural; ii) a inserção de um anel aromático na estrutura polimérica pode reduzir a hidrofobicidade do polímero oferecendo um

microambiente mais satisfatório para a clivagem do substrato; ou ainda, a corrente anisotrópica do anel aromático pode ser fator determinante na interação com o substrato também aromático e iii) a metilação do polímero pode gerar um ambiente com um maior grau de cargas positivas, via quaternização dos grupamentos amínicos, produzindo uma melhor estabilização de intermediários carregados, ou do íon *p*-nitrofenolato, produzidos durante a reação.

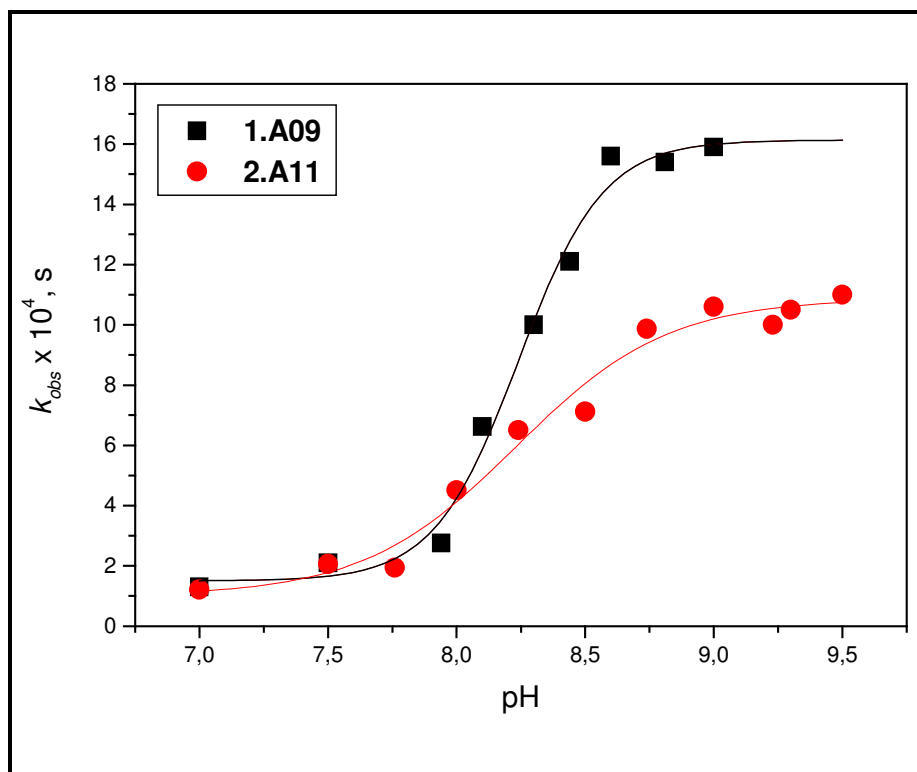
De qualquer forma, os grupos alquílicos em todos os quatro polímeros cataliticamente eficazes foram determinantes para os incrementos observados nas velocidades. E em nenhum caso os polímeros contendo somente grupos acetilas apresentaram resultados mais expressivos.

### 4.3 ANÁLISE DOS POLÍMEROS MAIS EFICIENTES

#### 4.3.1 Efeito do pH

Os polímeros que apresentaram resultados mais eficientes nas análises de cada biblioteca (**1.A09**, **2.A11**, **2.G09** e **3.E07**) foram selecionados e feitos estudos cinéticos mais detalhados. Para a análise da dependência das constantes cinéticas com a variação de pH, foram feitos perfis de pH para cada um dos polímeros.

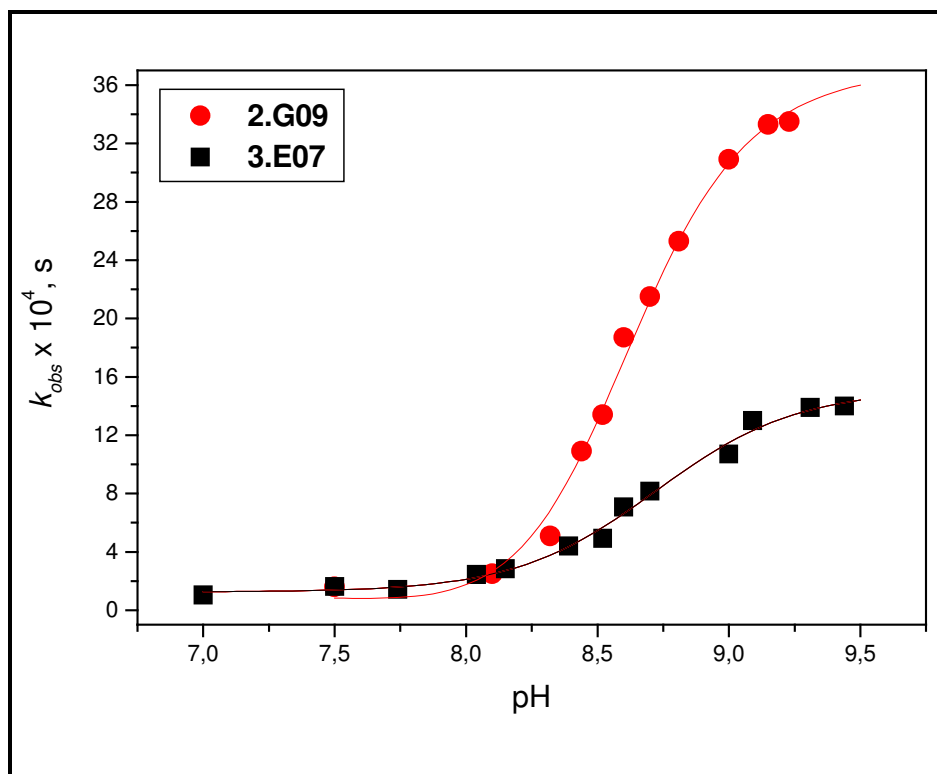
O efeito do pH sobre a eficácia catalítica da enzima artificial é de grande importância, pois, a partir da análise deste sobre a constante catalítica,  $k_{cat}$ , a constante de Michaelis-Menten e sobre a razão entre ambas podemos obter informação sobre a presença e a natureza de grupamentos ionizáveis, tanto no processo de agregação quanto no processo de catálise. Por isso, foram construídos perfis de pH, mostrado na Figura 26, para polímeros de maior eficiência catalítica derivatizados sem grupamentos acetilas, e na Figura 27 para os polímeros derivatizados com grupamentos acetilas.



**Figura 26.** Perfil de pH para os polímeros analisados na clivagem de pNPA. [pNPA] = 133  $\mu$ M, [polímero] = 0,4  $\mu$ M, tampão TRIS pH 7,0 – 9,3 e carbonato de sódio pH 9,3 - 9,5. 35 °C. (●) polímero 1.A09; (■) polímero 2.A11. Curvas ajustadas apenas com intuito de melhor visualização do gráfico.

Os perfis de pH foram construídos a partir de experimentos nos quais a concentração final de polímero era mantida em de 0,40  $\mu$ M e a final de pNPA em 133  $\mu$ M. Todas as soluções foram tamponadas com tampão TRIS para os pH entre 7,0-9,3 e tampão carbonato em pH 9,3-9,5.

Os perfis obtidos mostram que são evidentes as dependências das velocidades de reação da clivagem de pNPA com os pH para os quatro polímeros. A forma das curvas de pH sugere que a reação deve estar ocorrendo com a participação de catálise ácido-base geral.



**Figura 27.** Perfil de pH para os polímeros analisados na clivagem de pNPA. [pNPA] = 133  $\mu$ M, [polímero] = 0,4  $\mu$ M, tampão TRIS pH 7,0 – 9,3 e carbonato pH 9,3 - 9,4. 35 °C. (●) polímero **2.G09**; (■) polímero **3.E07**. Curvas ajustadas apenas com intuito de melhor visualização do gráfico.

Observa-se que nos polímeros onde não há a inserção de grupos acetílicos, mas somente grupos alquílicos como é o caso dos polímeros **1.A09** e **2.A11**, os  $pK_a$  aparentes ficaram em torno de 8,3. Enquanto os polímeros contendo grupos acetílicos e alquílicos na cadeia polimérica os  $pK_a$  aparentes se mostraram ligeiramente superiores, cerca de 8,7.

A polietilenoimina possui  $pK_a$  entre 9 e 10 devido as diferentes formas de grupos amínicos na cadeia polimérica,<sup>30</sup> que podem ser primários, secundários e terciários. Enquanto que a etilamina, com estrutura próxima da unidade monomérica do polímero, possui um  $pK_a$  de 10,67.<sup>50</sup> Na faixa de pH em que foram construídos os perfis de pH alguns grupamentos amínicos da polietilenoimina devem estar protonados. Dessa forma, a presença de sais de amônio na estrutura



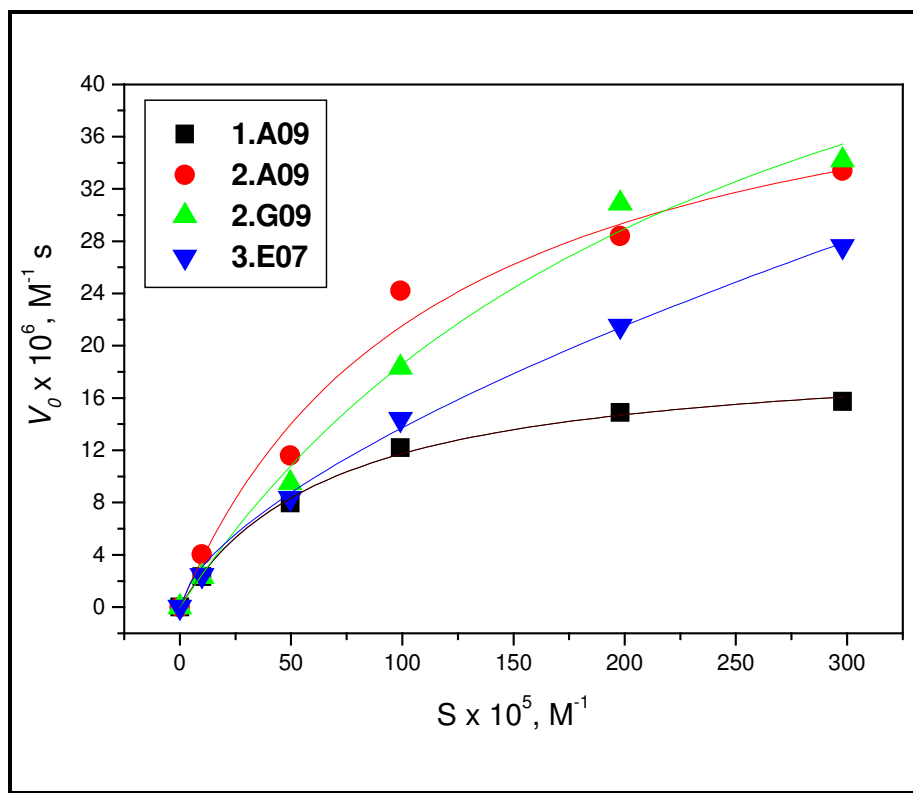
polimérica reduz a basicidade de grupos aminos primários e secundários também presentes no polímero funcionalizado.<sup>41,31</sup>

#### 4.3.2 Efeito da Concentração de Substrato

Os polímeros de maior eficácia cinética para a reação de clivagem do pNPA para cada uma das 3 bibliotecas também foram analisados segundo o modelo de Michaelis-Menten, variando-se a concentração de substrato e mantendo-se fixa a concentração da *synzyme*. A reação foi acompanhada em pH 7,76 onde a participação de catálise ácida ou básica específica pode ser excluída. Durante a aplicação do modelo de Michaelis-Menten para os estudos cinéticos, as enzimas artificiais apresentaram o mesmo comportamento que apresentam enzimas naturais.

Na Figura 28, são observados os comportamento para as *synzymes* analisadas em tampão TRIS 50 mM, concentração de *synzyme* a 0,8  $\mu$ M e pNPA variando na faixa de concentração de 0 a 2,98 mM.

É nítido o comportamento de saturação das *synzymes* pelo substrato. Os resultados foram então ajustados para a equação de Michaelis-Menten, Equação 5. Através dessa equação foram obtidos os parâmetros cinéticos,  $V_{max}$ ,  $K_M$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$ . Essa última é uma constante de segunda ordem aparente e é geralmente usada para comparar a eficiência de diferentes enzimas para um determinado substrato, ou seja, a especificidade da enzima para um dado substrato. Por isso, essa constante geralmente é chamada de constante de especificidade.<sup>1,51</sup>



**Figura 28.** Velocidades iniciais em função da concentração de pNPA num comportamento de saturação da enzima pelo modelo de Michaelis-Menten. [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [1.A9]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,7 a 35 °C. (●) polímero 1.A09; (■) polímero 2.A11; (▲) polímero 2.G09 e (▼) polímero 3.E07.

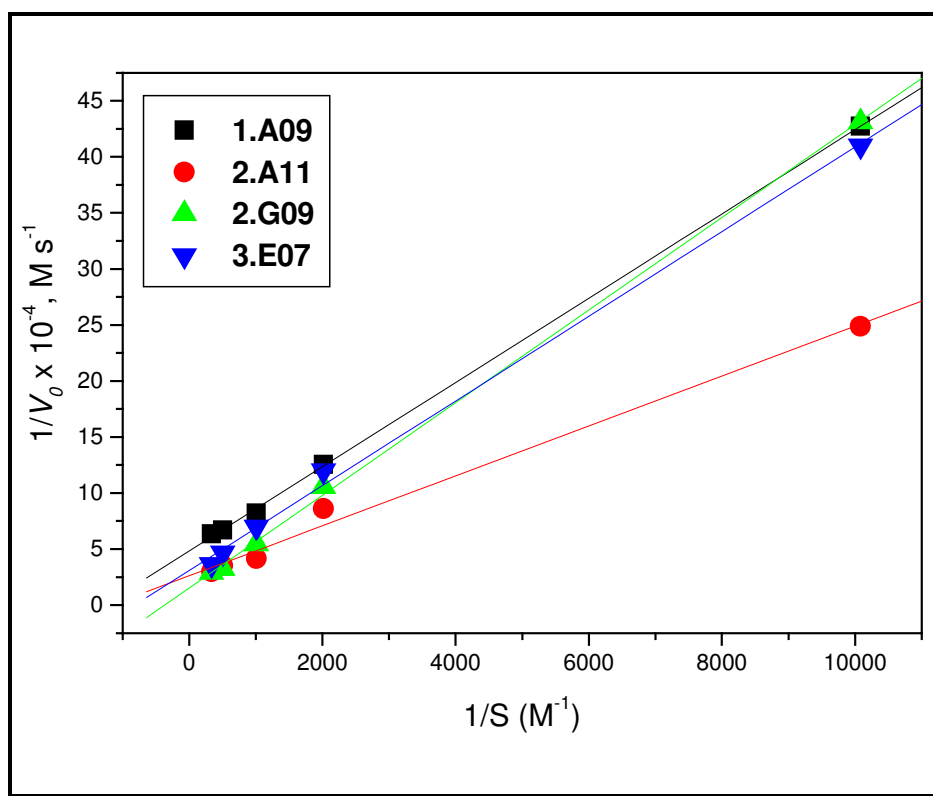
A velocidade máxima alcançada por 1.A09 (●) para a catálise do pNPA foi de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ , a constante de Michaelis,  $K_M$ , foi de  $6,80 \times 10^{-4} \text{ M}$ , o  $k_{cat}$  de  $25,00 \text{ s}^{-1}$  e a constante de especificidade foi de  $36764,70 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Os parâmetros cinéticos para a *synzyme* 2.A11, foram:  $V_{max} = 3,83 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 8,54 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 47,86 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 56071,34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Para o polímero 2.G09 os dados cinéticos de Michaelis-Menten foram:  $V_{max} = 7,00 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 2,51 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 87,50 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 34860,56 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . E para o polímero 3.E07 constantes de:  $V_{max} = 5,00 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 2,52 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 74,25 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 29464,28 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Para certificação dos resultados, as mesmas constantes também foram calculadas pelo método de linearização da equação de Michaelis-Menten, por

Lineweaver-Burk.<sup>1,51</sup> A Figura 29 representa o processo de linearização a partir da Equação 7.

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equação 7}$$

A partir dessa figura foram obtidos os dados resultantes da linearização.



**Figura 29.** Gráfico de Lineweaver-Burk obtido pela linearização da equação de Michaelis-Menten a partir dos dados da variação da concentração do substrato (0 - 2,98 mM) com a dos polímeros fixa em 0,8 μM. Tampão TRIS 50 mM pH 7,7 a 35 °C. (■) polímero **1.A09**, coef. correl. 0,9998; (●) polímero **2.A11**, coef. correl. 0,9955; (▲) polímero **2.G09**, coef. correl. 0,9997 e (▼) polímero **3.E07**, coef. correl. 0,9988.

Os parâmetros cinéticos calculados através desse método para o polímero **1.A09** foram:  $V_{max} = 2,07 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 7,79 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 25,80 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 33119,38 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Os parâmetros cinéticos para a *synzyme* **2.A11**, foram:  $V_{max} = 3,83 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 8,54 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 47,86 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 56071,34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Para o polímero **2.G09** os dados cinéticos de Michaelis-Menten foram:  $V_{max} = 6,58 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 2,71 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 82,10 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 30304,42 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . E para o polímero **3.E07** constantes de:  $V_{max} = 4,30 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ ,  $K_M = 2,22 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $k_{cat} = 53,75 \text{ s}^{-1}$  e  $k_{cat}/K_M = 29464,28 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

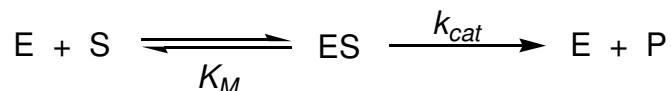
Esses resultados diferem pouco dos resultados utilizando-se a equação de Michaelis-Menten. Dessa forma, os resultados pela equação de Michaelis-Menten é que foram utilizados nesse trabalho. Os parâmetros cinéticos calculados através desse método para todos os polímeros funcionalizados e cataliticamente eficazes estão sumarizados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Comparação dos parâmetros cinéticos obtidos para as quatro *synzymes* das três bibliotecas a partir da variação de concentração de substrato.

Synzyme	Eq. acil.	Eq. alq.	Parâmetros cinéticos			
			$V_{max}$	$K_M$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_M$
			( $10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ )	(mM)	( $\text{s}^{-1}$ )	( $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
<b>1.A09</b>	0	1,2	2,00	0,68	25,00	36,76
<b>2.A11</b>	0	1,4	3,38	0,85	47,86	56,07
<b>2.G09</b>	1,8	1,2	7,00	2,51	87,50	34,86
<b>3.E07</b>	1,2	0,9	5,00	2,52	74,25	29,46

Uma inspeção dos resultados nos permite separar as enzimas artificiais em duas categorias: aquelas sem grupamentos acetílicos e as com grupamentos acetílicos. Os polímeros acetilados são, em geral, duas vezes mais reativos que os polímeros não acetilados; como sugerido por  $V_{max}$ .

Considerando-se o esquema reacional simples no qual o substrato, na presença da enzima, deve formar o complexo enzima-substrato num pré-equilíbrio para o qual se define  $K_M$ , e que o complexo enzima-substrato deve gerar o produto de reação na etapa lenta da reação, para a qual a constante catalítica,  $k_{cat}$ , é definida como o Esquema 8.



**Esquema 8.** Modelo de reação enzimática onde estão envolvidos a etapa de associação e catálise.

Esta maior reatividade dos polímeros acetilados é consequência de dois outros padrões, que também emergem do conjunto de dados na Tabela 9: i) os valores de  $K_M$  para os polímeros acetilados são, em média, 3,3 vezes maiores que os valores de  $K_M$  para os polímeros não acetilados. Isso sugere que os polímeros não acetilados são mais eficientes na agregação do pNPA, o substrato da reação; por tanto, um maior deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do complexo enzima artificial-substrato é esperado para esta classe de polímeros funcionalizados. ii) os polímeros acetilados são, em média, duas vezes mais eficazes para o processo de catálise para a formação do produto de reação; como pode ser inferido a partir dos valores de  $k_{cat}$ . A maior eficácia na etapa catalítica da reação pode ser reflexo da participação direta do grupo acetil no ataque nucleofílico ou, num esquema reacional mais complexo, resultado de sua participação direta na formação de um complexo enzima-intermediário.

Porém, apesar da maior eficácia na associação com o substrato e da maior atividade catalítica, a Tabela 10 também revela que os polímeros acetilados são, como demonstrado pelos valores de  $k_{cat}/K_M$ , relativamente menos específicos para o substrato da reação.

Ainda é possível comparar essas *synzymes* com enzimas naturais e outros modelos de enzimas artificiais produzidas por métodos diferentes; como por exemplo, a quimotripsina,<sup>12,13,14</sup> anticorpo catalítico,<sup>52</sup> cliclofano,<sup>53</sup> ciclodextrina,<sup>54</sup>

e polímero molecularmente impresso,<sup>55</sup> que catalisam a reação de clivagem de pNPA. Além destes, apresentamos também uma comparação entre os resultados obtidos neste trabalho e os dados cinéticos para a reação hidrolítica de um substrato específico, o metil N-acetil-L-triptofano<sup>12</sup> com a quimotripsina e *n*-propilamina.<sup>40</sup>

**Tabela 10.** Comparação dos parâmetros cinéticos das quatro *synzymes* das três bibliotecas com dados de enzimas naturais e artificiais.

Enzima	pH	Substrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>1.A09</b>	7,76 <sup>a</sup>	pNPA	0,68	25,00	36,76
<b>2.A11</b>	7,76 <sup>a</sup>	pNPA	0,85	47,86	56,07
<b>2.G09</b>	7,76 <sup>a</sup>	pNPA	2,51	87,50	34,86
<b>3.E07</b>	7,76 <sup>a</sup>	pNPA	2,52	74,25	29,46
<b>α- Quimotripsina</b>	7,80 <sup>b</sup>	pNPA	1,12	3,96	3,53
<b>δ-Quimotripsina</b>	7,60 <sup>b</sup>	pNPA	1,42	4,20	2,96
<b>δ-Quimotripsina</b>	7,92 <sup>b</sup>	MNATr <sup>h</sup>	0,09	36,40	379,17
<b>Ciclodextrina</b>	7,00 <sup>c</sup>	pNPA	0,40	0,06	0,15
<b>Anticorpo catalítico</b>	8,00 <sup>d</sup>	pNPA	0,08	0,007	0,87
<b>Ciclofano</b>	9,00 <sup>e</sup>	pNPA	-	-	0,018
<b>MIP<sup>i</sup></b>	7,50 <sup>f</sup>	pNPA	2,22	-	-
<b>Propilamina</b>	9,00 <sup>g</sup>	pNPA	-	0,00016	-

<sup>a</sup> Tampão TRIS-HCl, 35°C. <sup>b,e</sup> Força iônica 0,1 M, Tampão TRIS-HCl, 25 °C; <sup>c</sup> Tampão HEPES, 25 °C. <sup>f</sup> Tampão fosfato; <sup>g</sup> Tampão TRIS-HCl, 25 °C. <sup>h</sup> MNATr= Metil-N-acetil-L-triptofano. <sup>i</sup> Polímero molecularmente impresso.

A constante de Michaelis que mede a associatividade entre a enzima e o substrato, mostrou que as *synzymes* **1.A09** e **2.A11** promovem a associação com o pNPA muito mais efetivamente que as quimotripsinas. Já para a quimotripsina com um substrato específico, o resultado é diferente.

A associatividade dos polímeros desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa só é pior que a associação entre o anticorpo catalítico e a ciclodextrina e o pNPA –  $K_M$  igual a 0,08 e 0,40 mM, respectivamente ; ou entre a  $\delta$ -quimotripsina e seu substrato específico, o Metil-N-acetil-L-triptofano –  $K_M$  igual a 0,09 mM . A alta associatividade do anticorpo catalítico pode ser explicada pelo fato de que os anticorpos catalíticos são construídos a partir do análogo de estado de transição ao da reação estudada. Por isso, o reconhecimento e associação do anticorpo ao substrato possui uma constante de associação ( $K_M$ ) tão próxima quanto a da enzima quimotripsina para um substrato.

Para a etapa de catálise, se mostraram mais eficientes as *synzymes* **2.G09** e **3.E07** comparada às enzimas, com uma diferença de até 26 vezes, para o caso da reação entre **2.G09** e a  $\alpha$ -quimotripsina. Considerando-se a  $\delta$ -quimotripsina e seu substrato específico, esta diferença é pouco superior a 2 vezes, porém, com uma constante de especificidade 10 vezes menor. Os dados mostram que as *synzymes* catalisam a reação com uma eficácia tão grande quanto a dos melhores modelos até agora descritos pela literatura.

O conjunto de dados demonstra que, o reconhecimento molecular de uma enzima artificial pelo substrato é de grande importância, mas sozinho não é suficiente para produzir um catalisador eficiente como as enzimas. Isso pode ser exemplificado também para o caso da ciclodextrina que apresenta uma associação com o substrato eficiente  $K_M = 0,40$  mM, mas uma etapa de catálise pouco determinante,  $k_{cat} = 0,06$  s<sup>-1</sup>. No caso da ciclodextrina, não é um catalisador muito eficiente quando comparada às enzimas naturais aos polímeros estudados nesse trabalho.

Polímeros molecularmente impressos, também são construídos a partir de análogos do estado de transição das respectivas reações, mas ainda assim não

são capazes de promover uma associação tão mais efetiva que o pior dos modelos estudados nesse projeto, **2.G09** e **3.E07**.

Ciclofanos, como modelos artificiais de enzimas, não apresentam reconhecimento molecular por substratos em específico. A cavidade desses catalisadores deve ser suficiente apenas para abrigar o substrato, mas não contém, necessariamente, grupamentos capazes de promover o reconhecimento de forma efetiva.

A aminólise de pNPA pela propilamina é uma reação bimolecular e é um modelo reacional que não pode ser excluído para a reação utilizando os polímeros aqui estudados, porém, apresenta uma constante de velocidade cerca de até 600.000 vezes menor que para o polímero **2.G09**, estudado neste trabalho.

#### 4.3.3 Efeito do pH sobre os Parâmetros Cinéticos

Através de medidas de velocidade de reação em função da concentração de substrato, variando-se o pH, foi possível determinar simultaneamente os efeitos do pH sobre os parâmetros cinéticos:  $K_M$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$ . A partir desses perfis foi possível traçar algumas conclusões gerais sobre os grupos ionizáveis envolvidos nas reações de clivagem do pNPA.

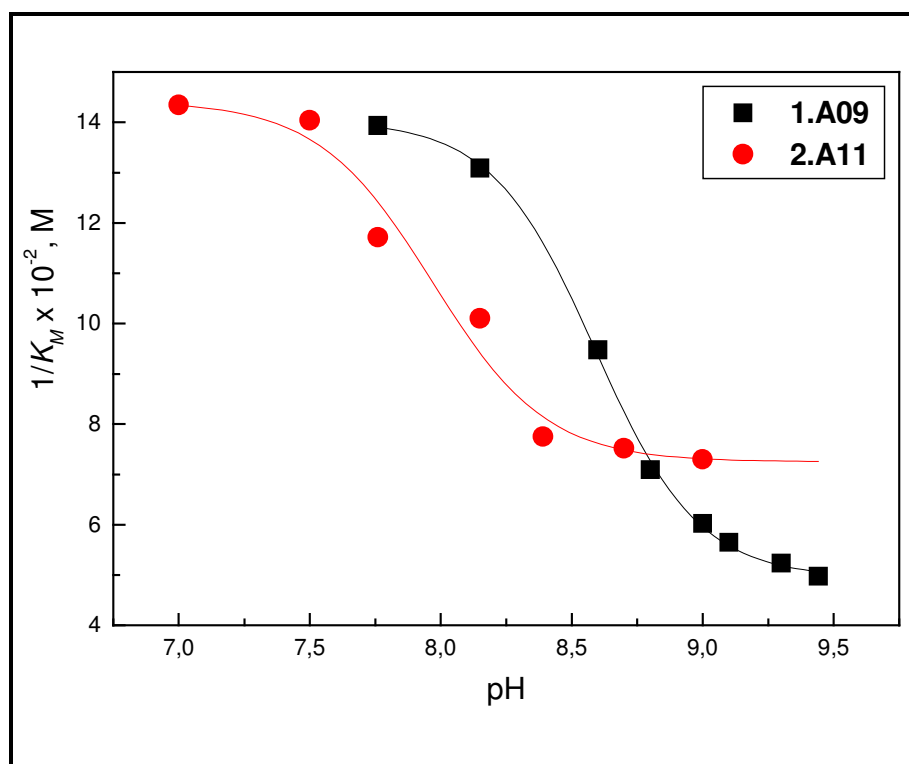
Os efeitos de pH sobre  $K_M$  refletem o envolvimento de grupos ácido-base essenciais à etapa inicial de ligação do substrato a enzima; o equilíbrio que precede a catálise. A dependência de pH sobre o  $k_{cat}$  é refletida principalmente sobre o envolvimento de grupos ácido-base na etapa de catálise; conversão do substrato em produto. Já  $k_{cat}/K_M$  em função de pH reflete a ionização de grupos essenciais na enzima livre envolvidos tanto na etapa de ligação como de catálise do substrato.<sup>1</sup>

Sendo assim, foram obtidos os parâmetros cinéticos em função do pH. Na Figura 30 é mostrado o gráfico obtido para variação de  $1/K_M$  em função do pH. O valor de  $1/K_M$  é interpretado como uma constante de associação  $K_{ass}$  que,



expressa em função do pH, fornece uma idéia sobre o comportamento de grupos ionizáveis durante a associação do substrato com a enzima.

Para melhor visualização, os resultados foram divididos em dois grupos, os polímeros aqui estudados que não contém grupos acetilas, somente grupos alquílicos, **1.A09** e **2.A11**, e os que contém tanto grupos alquílicos e acetílicos, **2.G09** e **3.E07**.



**Figura 30.** Dependência de  $1/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **1.A09** (■) e **2.A11** (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35  $^{\circ}$ C.

Na Figura 30 são observadas as variações de  $1/K_M$  em função do pH para os polímeros **1.A09** e **2.A11**. Observa-se um aumento da associação entre polímero e substrato a medida que o pH do meio é reduzido. Considerando que o  $pK_a$  aparente de **1.A09** e **2.A11** é 8,60 e 8,30 respectivamente, um valor bastante próximo dos valores de  $pK_a$  obtidos para os grupamentos amino do próprio polímero. Pode-se concluir que a protonação destes grupos promovem a associação entre polímero e substrato deslocando o equilíbrio para a formação do

complexo enzima-substrato e conseqüentemente produto de reação. Isso é indício de que uma ligação de hidrogênio envolvida nessa etapa seja crucial para a formação do complexo polímero-substrato nos dois sistemas de polímeros.

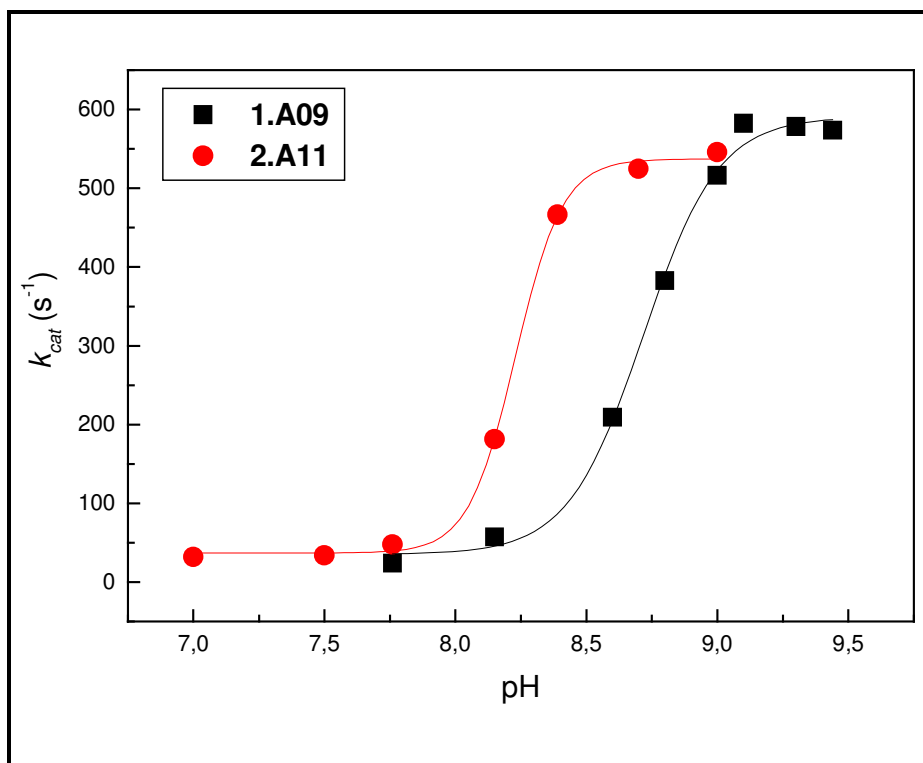
Os resultados da análise da dependência de  $k_{cat}$  em função do pH para os polímeros **1.A09** e **2.A11** podem ser observados na Figura 31. São evidentes as dependências das constantes da etapa catalítica com o pH para os dois polímeros pois, à medida que o pH aumenta, as constantes de velocidade para a etapa de catálise também aumentam até atingir-se um platô a partir de pH igual a 9,1 para **1.A09** e de pH igual a 8,7 para **2.A11**. Os  $pK_a$  aparentes obtidos são essencialmente os mesmos que os obtidos para os grupamentos responsáveis pelo processo de associação, ou seja, de cerca de 8,70 para **1.A09** e 8,30 para **2.A11**. Porém, ao contrário do observado na etapa de associação, a desprotonação de um grupamento na macro-estrutura polímero-substrato causa um aumento na catálise.

Na Figura 32 são observados as constantes de especificidade  $k_{cat}/K_M$  em função do pH novamente para os dois polímeros discutidos. Os  $pK_a$  aparentes se referem ao somatório das mesmas etapas anteriormente discutidas, associação e catálise. No caso do polímero **1.A09** aparecem dois  $pK_a$  num perfil em forma de sino. A partir deste observa-se que um grupo em sua forma protonada promove a associação, região de maior pH no sino (9,2-9,4), e o outro na forma desprotonada promove a catálise (pH 7,7-9,2), região de menor pH no sino.

Estes dados estão de acordo com aqueles previamente apresentados. A especificidade máxima é atingida em pH igual a 9,2.

Para o polímero **2.A11** o perfil de sino não é observado, mas o  $pK_a$  aparente é próximo dos dois obtidos nos gráficos anteriores que é de cerca de 8,2.

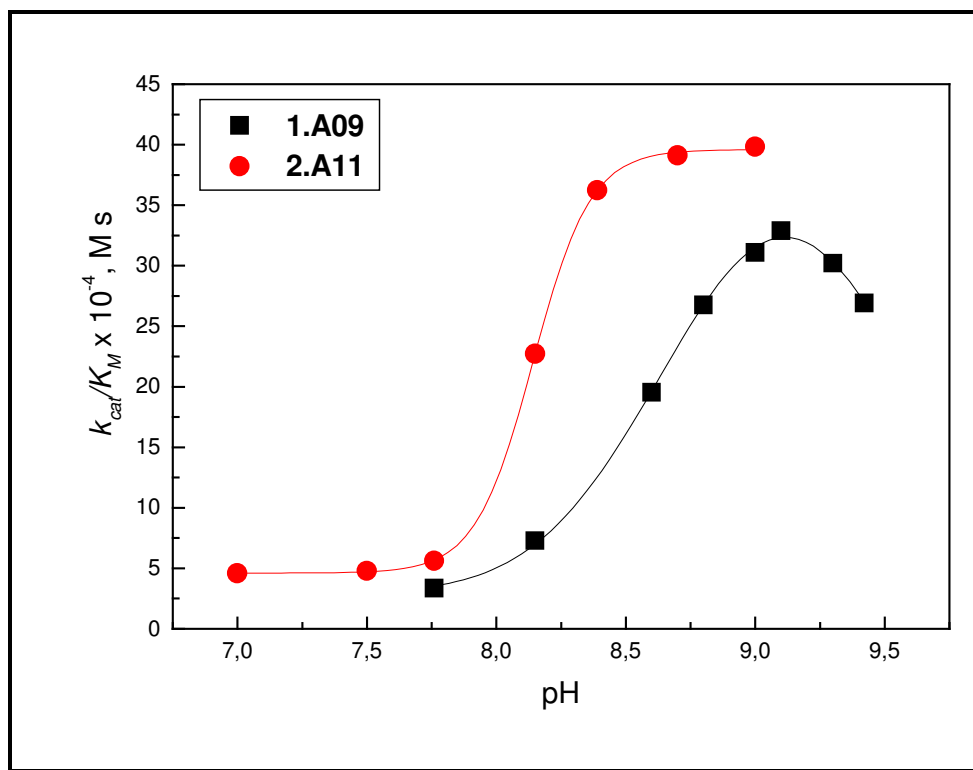
A dependência da constante de associação,  $1/K_M$ , do polímero **2.G09** e **3.E07** com o pH é mostrado na Figura 33.



**Figura 31.** Dependência de  $k_{cat}$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **1.A09** (■) e **2.A11** (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35 °C.

Ao contrário do que ocorre com os polímeros não acetilados, em ambos os casos observa-se um aumento da associação polímero substrato a medida que o pH aumenta; ou seja, nesse caso um grupamento ionizável em sua forma desprotonada melhora o processo de reconhecimento do substrato.

Analisando-se a Figura 34, etapa catalítica, conclui-se que para os dois polímeros, as constantes catalíticas aumentam a medida que o pH aumenta e, a exemplo do que ocorre com os polímeros não acetilados, um grupo funcional dissociado contribui para o aumento de velocidade durante a decomposição do complexo polímero-substrato e formação do produto de reação. Os  $pK_a$  aparentes para os dois polímeros acetilados são bem próximos, em torno de 8,0; o que sugere uma etapa de catálise com grupos funcionais similares para os dois polímeros.



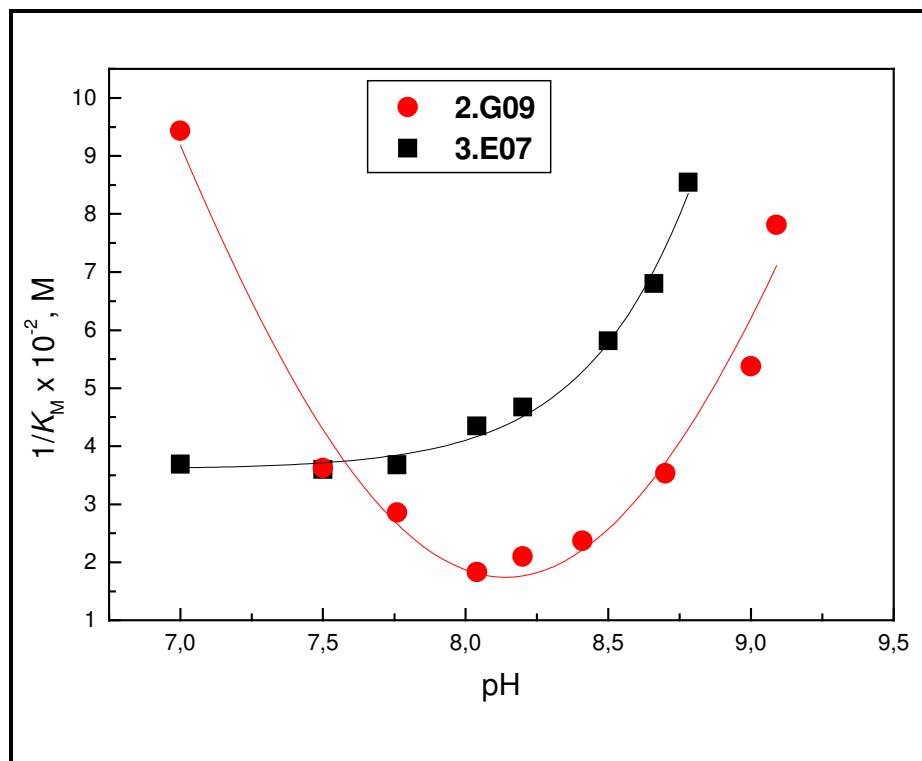
**Figura 32.** Dependência de  $k_{cat}/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **1.A09** (■) e **2.A11** (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,3 e carbonato pH 9,3-9,4 a 35  $^{\circ}$ C.

O gráfico de  $k_{cat}/K_M$  em função do pH Figura 35, mostra o perfil obtido para a sobreposição da etapa de associação e para a etapa de catálise e é associado a existência de grupos ionizáveis na “enzima” livre. Em pH próximo de 8,5 as constantes de especificidades têm seu valor máximo nos dois casos.

O dois valores de  $pK_a$ , obtidos a partir do gráfico de  $k_{cat}/K_M$ , associados a presença de grupamentos funcionais livres nos polímeros acetilados, são consistentes com um modelo proposto na Figura 36.

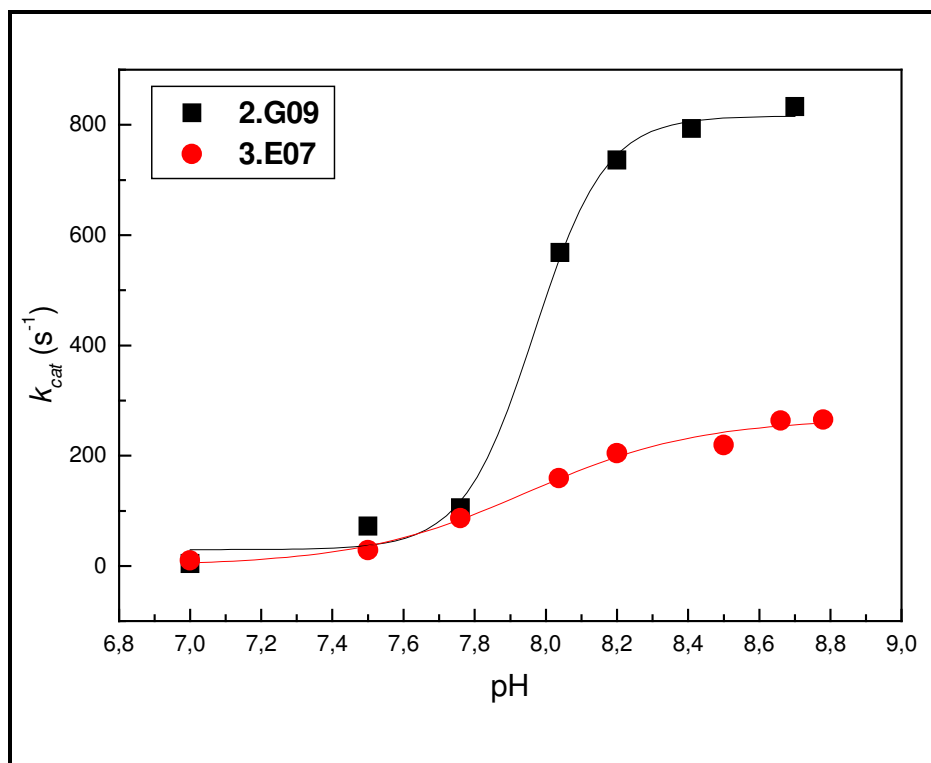
Neste modelo uma cavidade, formada pela estrutura dorsal da cadeia polimérica, é mantida por meio da formação de ligação de hidrogênio entre dois grupos aminos **1** e **2**. A manutenção desta cavidade, via ligação de hidrogênio, é necessária ao processo de associação entre enzima e substrato para a formação do complexo tipo enzima-substrato e a desprotonação de um destes grupos, amina **2** por exemplo, aumentaria a basicidade de seu átomo de nitrogênio e

conseqüentemente a possibilidade da formação da ligação de hidrogênio o que contribuiria para a estruturação da cavidade permitindo, com isso, a interação entre as espécies de reação. Alternativamente, a desprotonação do grupamento **3**, induzida pela presença de um grupo carboxilato, **4**, em suas proximidades, auxilia a complexação do substrato para a formação do intermediário tetraédrico.



**Figura 33.** Dependência de  $1/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **2.G09** (●) e **3.E07** (■). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,1 a 35 °C.

Por outro lado, como sugere a Figura 36, um segundo grupo funcional – desta vez protonado, também está presente na estrutura da enzima artificial e contribui aditivamente com o processo de complexação. Sob nosso ponto de vista, este seria um segundo grupo amino, amina **5**, cuja protonação é necessária para fixação do substrato e simultaneamente participaria da etapa de catálise para a formação de um intermediário polímero-substrato.



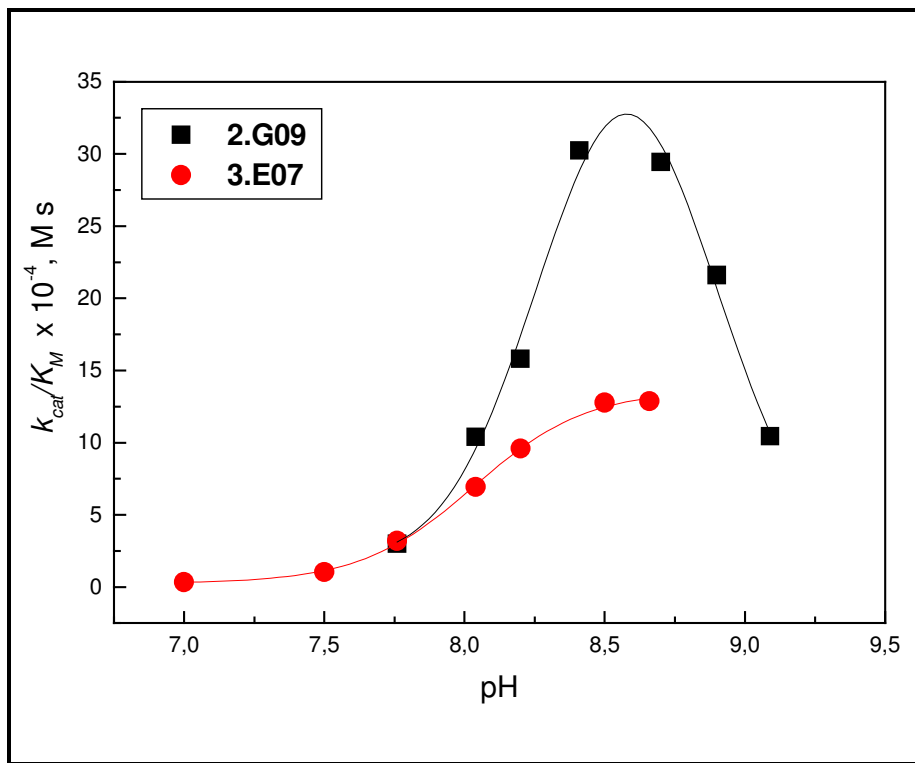
**Figura 34.** Dependência de  $k_{cat}$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **2.G09** (●) e **3.E07** (■). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-8,8 a 35 °C.

A Figura 37 é uma representação da participação de um grupamento amino, **6**, na etapa de cisão do intermediário polímero-substrato, a etapa catalítica.

A desprotonação deste grupo amino, promovida por um grupo carboxilato, **4**, aumenta sua basicidade tornando-o apto a atuar como um catalisador básico geral para a desprotonação de uma molécula de água, que por sua vez terá sua capacidade nucleofílica aumentada. Este aumento de nucleofilicidade, a exemplo do que ocorre com o mecanismo de atuação da quimotripsina, é expresso na atuação como nucleófilo.

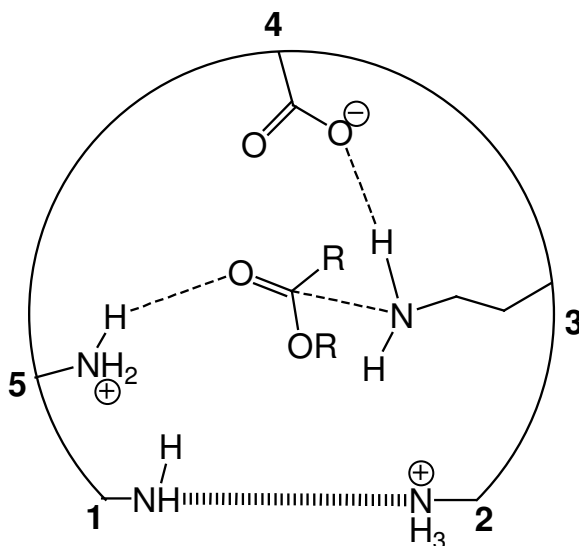
Polímeros derivatizados, tal qual uma enzima, podem conter vários sítios ativos<sup>42, 30</sup> constituídos de diferentes grupos catalíticos. Isso pode significar que os  $pK_a$  aparentes encontrados podem ser um resultado médio dos diferentes grupos catalíticos de diferentes sítios ativos das *synzymes*. Portanto, é difícil determinar

quais grupos catalíticos do polímero derivatizado podem estar envolvidos na reação.



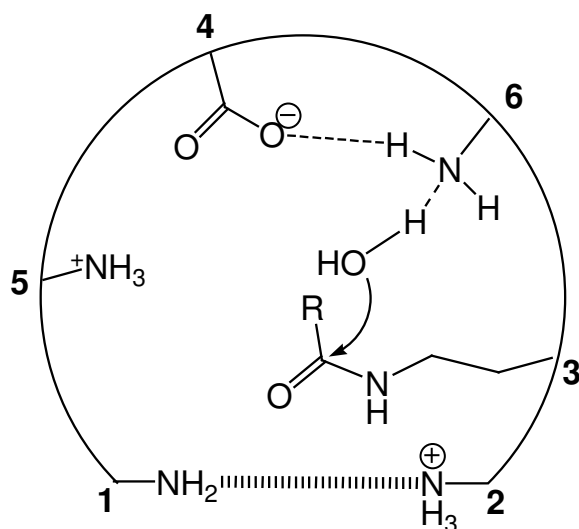
**Figura 35.** Dependência de  $k_{cat}/K_M$  com a variação de pH para a reação de clivagem de pNPA pelos polímeros **2.G09** (■) e **3.E07** (●). [pNPA]= 0 - 2,98 mM, [polímero]= 0,8  $\mu$ M, tampão TRIS 50 mM pH 7,0-9,1 a 35 °C.

O fato de que foram obtidos  $pK_a$ , mesmo que aparentes, menores para as reações estudadas pelos quatro polímeros comparados ao PEI não derivatizado já é um indício de que os polímeros por si só foram derivatizados e os grupos funcionais agregados aos polímeros provocaram as diminuições dos  $pK_a$ .



**Figura 36.** Modelo para interpretação dos grupos ionizáveis presentes no polímero artificial que contém grupos acetilas combinados com alquilas durante a etapa de associação polímero-substrato.

Isso indica de que as derivatizações ocorreram como esperado apesar de não termos obtido dados mais completos sobre a estrutura dos mesmos.



**Figura 37.** Modelo para interpretação dos grupos ionizáveis presentes no polímero artificial que contém grupos acetilas combinados com alquilas durante a etapa de catálise do substrato.



## 5 CONCLUSÃO

A polietilenoimina foi derivatizada de forma combinatorial com diferentes reagentes com o propósito de se obter enzimas artificiais. Três bibliotecas foram construídas contendo uma faixa de derivatizantes de 0-1,8 eq. de reagentes acetilantes e 0-1,4 eq. de reagentes alquilantes: **(1)** contendo dodecil como reagente alquilante; **(2)** contendo benzil e **(3)** contendo metil. A detecção dos polímeros derivatizados foram testados a fim de selecionar os mais eficientes na hidrólise de pNPA.

Para a biblioteca **(1)** foi selecionado o polímero **1.A09** contendo 1,2 equivalentes de reagente dodecilante. Para a segunda biblioteca dois polímeros distintos foram ressaltados, **2.A11**, contendo 1,4 equivalentes de reagente benzilante e **2.G09** contendo uma combinação de **1,8** equivalentes de reagente acilante e 1,2 de reagente benzilante. E na biblioteca **(3)** o polímero **3.E07** derivatizado com 1,2 equivalentes de reagente acilante e 0,9 de reagente metilante.

Esses polímeros foram estudados por perfis de pH, variação de concentração de substrato e dependência de parâmetros cinéticos com o pH para serem caracterizados como enzimas artificiais. Todos os polímeros seguiram o Modelo de Michaelis-Menten para a saturação da *synzyme* com o substrato e os parâmetros cinéticos mostraram grande eficiência comparados com enzimas naturais e artificiais.

Enquanto os polímeros derivatizados com apenas grupos alquílicos se mostraram mais eficientes na etapa de associação ao substrato, os polímeros derivatizados com combinações de grupos alquílicos e acílicos se mostraram mais eficientes na etapa de catálise.

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten em função do pH também mostraram que os polímeros contendo apenas grupos alquilas mostraram um comportamento diferente dos polímeros derivatizados com grupos alquilas e acilas. A falta de ajuste dos resultados impediram a determinação mais precisa de  $pK_a$  envolvidos, sendo possível somente a determinação de  $pK_a$  aparentes.

Os  $pK_a$  obtidos devem ser resultado de uma média dos sítios ativos distintos dos polímeros, já que podem possuir mais de um. Porém, o fato de se obter  $pK_a$  com valores abaixo dos atribuídos ao PEI não derivatizado é um indício de que houve a funcionalização dos polímeros estudados e que promoveram a catálise da reação de clivagem de acetato de *p*-nitrofenila agindo como um modelo de enzima.

## 5.1 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de enzimas artificiais a partir da derivatização de polietilenoimina mostrou um caminho de grande potencial para se obter resultados catalíticos muito próximos das enzimas naturais. Os resultados se mostraram surpreendentes, mas ainda há a necessidade de se compreender o mecanismo pelo qual a reação estudada é catalisada, além de serem obtidos mais resultados para as enzimas artificiais com outros reagentes derivatizantes. A purificação desses polímeros por liofilização é uma etapa importante, pois, os dados cinéticos obtidos para os polímeros puros seriam mais confiáveis.

A elucidação de mecanismo pelo qual as enzimas promovem suas reações em específico pode levar anos de intensas pesquisas. O fato de que inúmeros sítios ativos diferentes que podem estar atuando na reação de hidrólise de pNPA pelas enzimas artificiais aqui estudadas pode dificultar o esclarecimento do que se é proposto. Mas, é a partir de resultados cinéticos simples que os esclarecimentos podem ter início.

O resultado do uso de diferentes solventes e inibidores, como surfactantes de diferentes cargas, pode ajudar nesse entendimento, além da necessidade da determinação da estrutura dos polímeros por métodos de raio-X e RMN  $^1\text{H}$  entre outros. A partir destas informações, novos catalisadores hidrolíticos baseados em polímeros sintéticos podem ser disponibilizados para reações específicas em ambientes nos quais as enzimas não podem ser utilizadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-VCH Inc. 2000. 390p.
2. BENKOVIC, S. J. and HAMMES-SHIFFER, S. A perspective on enzyme catalysis. **Science**. v. 301, p. 1196-1202, 2003.
3. ARIGA, K. and KUNITAKE, T. **Supramolecular chemistry – fundamentals and applications**. Berlin: Springer-Verlag. 2006. 208p.
4. DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. **Nature**. v. 412, p. 397-400, 2001.
5. STRYER, L; BERG, J. M; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. 5<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2002. 1050p.
6. VOET, D; VOET, J.G; Pratt, C.W. **Fundamentals of Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1999. 1596p.
7. GARCIA-VILOCA, M; GAO, J; KARPLUS, M. and TRUHLAR, D. G. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. **Science**. v. 303, p. 186-194, 2004.
8. COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2005. 1119p.
9. FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3<sup>th</sup> ed. New York: Springer –Verlag. 1997.

10. BURRELL M. M. **Methods in molecular biology**. v. 16. Totowa: Humana Press Inc. 1993.
11. MARINI, M. A. and HESS, G. P. The  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **J. Am. Chem. Soc.** v. 82, p. 5160-5165, 1959.
12. VALENZUELA, P. and BENDER, M. L. Alkaline pH dependence of  $\delta$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of specific substrates. **Biochemistry**. v. 63, p. 1214-1221, 1969.
13. HARDMAN, M. J; VALENZUELA, P. and BENDER, M. L. Acylation of  $\alpha$ - and  $\delta$ -chymotrypsin by *p*-nitrophenyl acetate. **J. of Biol. Chem.** v. 246, n.19, p. 5907-5913, 1971.
14. KEZDY, F. J. and BENDER, M. L. The kinetics of the  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**. v. 1, n. 6, p. 1097-1106, 1962.
15. MOTHERWELL, W. B; BINGHAM, M. J. and SIX, Y. Recent progress in the design and synthesis of artificial enzymes. **Tetrahedron**. v. 57, p. 4663-4686, 2001.
16. ASLYN, E. V. and DOUGHERTY, D. A. **Modern Physical Organic Chemistry**. Sausalito: University Science Books. 2005. 1104p.
17. BRESLOW, R. and SHMUCK, C. Goodness of fit in complexes between substrates and ribonuclease mimics: effects on binding, catalytic rate constants, and regiochemistry. **J. Am. Chem. Soc.** v. 118, p. 6601-6605, 1996.

18. BRESLOW, R. How do imidazole groups catalyze the cleavage of rna in enzyme models and in enzymes? Evidence from "negative catalysis". **Acc. Chem. Res.** v. 24, n. 11, p. 317-324, 1991.
19. LAI, C. F; ODASHIMA, K. and KOGA, K. Synthesis and properties of water-soluble bis-paracyclophanes. **Tetrahedron**.v. 26, p. 5179-5182, 1985.
20. DHAENES, M; LACOMBE, L; LEHN, J. M. and VIGNERON, J. P. Binding of acetylcholine and other molecular cations by a macro cyclic receptor molecule of spealand type. **J. Am. Chem. Soc.** p. 1097-1099, 1984.
21. DIEDERICH, F. Complexation of neutral molecules by cyclophane hosts. **New. Chem. Eng. Int. Ed.** v. 27, p. 362-386, 1988.
22. PETTI, M. A; SHEPODD, T. J; BARRANS, R. E. and DOUGHERTY, D. A. hydrophobic binding of water-soluble guests by high-symmetry, chiral hosts. An electron-rich receptor site with a general affinity for quaternary ammonium compounds and electron-deficient  $\pi$  systems. **J. Am. Chem. Soc.** v. 110, p. 6825-6840, 1988.
23. DIEDERICH, F. and HABICHER, T. Catalytic dendrophanes as enzyme mimics. Synthesis, binding properties, micro polarity effect, and catalytic activity of dendritic thiazolio-cyclophanes. **Helv. Chim. Acta.** v. 82, p. 1066-1095, 1999.
24. BRESLOW, R. **Artificial Enzymes**. Weinheim: Wiley-VHC. 2005. 181p.
25. TARLEY, C. R. T; SOTOMAYOR, M. e KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte1: preparo e aplicações de mip em técnicas de extração e separação. **Quím. Nova.** v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

26. WULFF, G. Enzyme-like catalysis by molecular imprinted polymers. **Chem. Rev.** v. 102, n. 1, p. 1-27, 2002.
27. ROBINSON, D. K. e MOSBACH, K. Molecular imprinting of a transition state analogue leads to a polymer exhibiting esterolytic activity. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** p. 969-970, 1989.
28. OVERERGER, C. and MORIMOTO, M. Conformational effects and nonpolar interactions in poly[4(5)-vinylimidazole]-catalyzed solvolyses of neutral substrates. **J. Am. Chem.** v. 93, p. 3222-3227, 1971.
29. JOHNSON, T. W. and KLOTZ, I. M. Preparation and characterization of some derivatives of polyethyleneimine. **Macromolecules.** v. 7, n. 2, p. 149-153, 1974.
30. HOLLFELDER, F; KIRBY, A. J. and TAWFIK, D. S. On the magnitude of medium effects in enzyme-like catalyst for proton transfer. **J. Org. Chem.**, v. 66, n. 17, p. 5866-5874, 2001.
31. ARCELI, A. and CONCILIO, C. Kinetics and mechanism of aminolysis of phenyl acetates in aqueous solution of polyethyleneimine. **J. Org. Chem.** v. 61p. 1682-1688, 1996.
32. SUH, J; SCARPA, I. S. and KLOTZ, I. M. Catalysis of decarboxylation of nitrobenzoxazolecarboxylic acid and of cyanophenylacetic acid by modified polyethylenimines. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 98, n. 22, p. 7060-7064, 1976.
33. MENDER, F. M; WEST, C. A. and DING, J. A combinatorially developed reducing agent. **Chem. Commun.** v. 7, p. 633-634, 1997.

34. KLOTZ, I. M. and ROYER, G. P. Enhanced rates due to apolar interactions between polymer and substrate. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 91, n. 21, p. 5885-5886, 1969.
35. KLOTZ, I. M. and STRYKER, V. H. Macromolecule-small molecule interactions. a synthetic macromolecule with high estereolitic activity. **J. Am. Chem. Soc.** v. 90, n. 10, p. 2717-2719, 1968.
36. LIU, L. and BRESLOW, R. A potent polymer/pyridoxamine enzyme mimic. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 124, p. 4978-4679, 2002.
37. MERDAN, T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. **Advanced Delivery Rewiews.** v. 54, p. 715-758, 2002.
38. KLOTZ, I. M. and STRYKER, V. H. Denaturation of a synthetic polymer and its relationship to protein denaturation. **J. Am. Chem. Soc.** v. 82, p. 5169-5170, 1960.
39. GRUHN, W. B. and BENDER, M. L. Enhanced rates due apolar interactions between polymer and substrate. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 91, n. 21, p. 5885-5886. 1969.
40. KLOTZ, I. M; ROYER, G. P. and SCARPA, I. S. Synthetic derivatives of polyethyleneimine with enzyme-like activity (*synzymes*). **J. Am. Chem. Soc.** v. 68, n. 2, p. 263-264, 1971.
41. HOLLFELDER, F; KIRBY, A. and TAWFIK, D. Efficient catalysis of proton transfer by *synzymes*. **J. Am. Chem. Soc.** v. 119, p. 9578-9579, 1997.

42. AVENIER, F.; DOMINGOS, J. B; VAN VLIET, L. D. and HOLLFELDER, F. Polyethylene imine derivatives ('*synzymes*') accelerate phosphate transfer in the absense of metal. **J. Am. Chem. Soc.** v. 129, n. 24, p. 7612-7619, 2007.
43. JIN, T.; ZHAO, Y; LIU, L. Rapid and efficient method for acetylation of alcohols and phenols with acetic anhydride catalyzed by silica sulfate. **Synth. Comm.** v. 36, n. 9, p. 1221-1227, 2006.
44. GOREN, J; FRIDKIN, M. The hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate in water. **Eur. J. Biochem.** v. 41, p. 263-272, 1974.
45. DAGANI, R. A faster route to new materials. **Chem. Engin. News.** v. 77, n. 10, p. 51-60, 1999.
46. LEBL, M. Parallel personal comments on "classical" papers in combinatorial chemistry. **J. Comb. Chem.** v. 1, n. 3, p. 3-24, 1991.
47. GESSER, J. C. Investigação do processo de formação e quebra de ligações químicas para estado de transição de processos enzimáticos. Relatório de estágio de pós-doutorado. Trabalho não publicado. Florianópolis, 2004.
48. SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6<sup>a</sup> ed. v. 2, Rio de Janeiro: LTC S.A. 1996. 554p.
49. CREA, F; CREA, P; ROBERTIS, A. and SAMMARTANO, S. Thermodynamic. study for the protonation of branched polyethylenimine in NaCl<sub>(aq)</sub> and its dependence on ionic strength. **J. Chem. Eng. Data.** v. 52, p. 279-285, 2007.



50. UM, I; HONG, J. and SEOK, J. Effect of substituent on regioselectivity and reaction mechanism in aminolysis of 2,4-dinitrophenyl x--substituted benzenesulfonates. **J. Org. Chem.** v. 70, p. 1438-1444, 2005.
51. FERSHT, A. **Structure and mechanism in protein science**. New York: W. H. Freeman Co. 2nd Ed. 1999. 631p.
52. JACOBS, J. and SCHULTZ, P. G. Catalytic Antibodies. **J. Am. Chem. Soc.** v. 109, p. 2174-2176, 1987.
53. LARA, K. O; ALCÁNTAR, C. G; ELISEEV, A. V. and YATSIMIRSKY, A. K. Ester cleavage by S,S-(+)-etrandrinederivative bearing thiol groups. **Arkivoc.** v. 6, p. 293-306, 2005.
54. BRESLOW, R. and NESNAS, N. Burst kinetics and turnover in an esterase mimic. **Tetrahedron Letters.** v. 40, p. 3335-3338, 1999.
55. LETTAU, K; WARSINKE, A; LASCHEWSKY, A; MOSBACH, K; YILMAZ, E. and SCHELLER, F. W. An Esterolytic imprinted polymer prepared via a silica-supported transition state analogue. **Chem. Mater.** v. 16, p 2745-2749, 2004.